

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Имобилизованные клетки и ферменты

Методы

Под редакцией
ДЖ. ВУДВОРДА

Перевод с английского
Е. В. ДАЙНИЧЕНКО,
канд. хим. наук Г. П. САМОХИНА

под редакцией
чл.-корр. АН СССР

И. В. БЕРЕЗИНА



Москва «Мир» 1988

IMMOBILISED CELLS AND ENZYMES

A PRACTICAL APPROACH

Edited by J. Woodward

**Oak Ridge National Laboratory,
Oak Ridge, TN 37831, USA**

**IRL Press
Oxford • Washington DC**

Имобилизованные клетки и ферменты

Методы

Под редакцией
ДЖ. ВУДВОРДА

Перевод с английского
Е. В. ДАЙНИЧЕНКО,
канд. хим. наук Г. П. САМОХИНА

под редакцией
чл.-корр. АН СССР

И. В. БЕРЕЗИНА



Москва «Мир» 1988

ББК 28.072
В 88
УДК 577.15.02

Авторы:

Бидей С. П., Броделиус П., Кабрал И. М. А., Кафлэн М. П.,
Нето Г. де О., Гильбо Ж. Ж., Хиггинс И. Дж., Кеннеди Д. Ф.,
Кирстен М. П. Дж., Клей Г. Э., Кощеенко К. А., Шим Д.,
Суходольская Г. В., Сандстрем Д. У., Уингард Л. Б., мл.,
Вудворд Дж.

Имобилизованные клетки и ферменты. Методы: Пер. с
В 88 англ./Под ред. Дж. Вудворда. — М.: Мир, 1988. — 215 с., ил.
ISBN 5-03-001070-X

Книга международного коллектива авторов (из Англии, США, СССР, Швейцарии и др. стран) представляет собой сборник современных методов, рекомендуемых для получения стабилизированных препаратов клеток и ферментов и их использования в практических целях.

Для специалистов в области биотехнологии, биохимиков, химиков.

В 2001040000—408 133—88, ч. 1
041(01)—88

ББК 28.072

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-001070-X (русск.)
ISBN 0-947946-21-7 (англ.)

© 1985 IRL Press Limited
© перевод на русский язык,
«Мир», 1988

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

Прошедшее десятилетие характеризуется бурным развитием целого ряда сопряженных дисциплин, объединенных под общим названием «биотехнология». Этот раздел науки, основываясь на последних достижениях в области микробиологии, биохимии и молекулярной генетики, ставит своей целью использование процессов, протекающих под действием ферментов, для получения необходимых человеку продуктов. В основе разработок лежит уникальная способность ферментов ускорять реакции в десятки и сотни раз в условиях физиологической температуры и давления, что заметно удешевляет технологические процессы. Высокая специфичность ферментативного катализа обеспечивает большие выходы продукта и позволяет создавать практически безотходные производства, не загрязняющие окружающую среду.

В последнее время эффективность ферментативных процессов, используемых в самых различных областях человеческой деятельности, таких как медицина, энергетика, пищевая промышленность, микроэлектроника, удалось увеличить с помощью иммобилизации ферментов. Однако применение ферментов ограничено из-за их низкой стабильности и высокой стоимости чистых препаратов. Поэтому в настоящее время наряду с иммобилизацией ферментов внимание исследователей все больше привлекает иммобилизация клеток и органелл. Поскольку клетки микроорганизмов являются поистине бесконечным источником самых разнообразных ферментов, естественно, что в первую очередь именно они были использованы для иммобилизации. Полагают, что иммобилизация клеток микроорганизмов даст ряд преимуществ как перед обычно применяемыми свободными клетками, так и перед иммобилизованными ферментами. Живая клетка, в отличие от фермента, представляет собой готовый биотехнологический реактор, в котором реализуются не только процессы, приводящие к образованию конечного продукта, но и ряд других, способствующих поддержанию каталитической эффективности системы на высоком уровне (например, регенерация кофакторов).

Для иммобилизации клеток было испробовано множество способов (сорбция инертными и ионообменными носителями, поперечная сшивка бифункциональными реагентами, ковалентное связывание с полимерным носителем, включение в гель) и носи-

телей разных типов (природные и синтетические полимеры и неорганические вещества). Наибольшее распространение получили работы по включению клеток в полиакриламидный гель, что объясняется, вероятно, доступностью этого метода и инертностью полимера по отношению к клеткам.

Интерес, проявляемый учеными к работам по иммобилизации клеток, находит свое отражение в числе публикаций, которое с каждым годом быстро растет. К сожалению, в отечественной литературе эта тема раскрыта недостаточно, относящиеся к ней работы опубликованы в основном в сборниках трудов школ по микробиологии, которые проходили на базе научного центра биологических исследований АН СССР в Пущино. В мировой научной литературе она представлена в сборниках трудов конференций, которые публикуются в очень короткие сроки и дают представление о наиболее перспективных направлениях исследований в области создания катализаторов на основе иммобилизованных клеток, но общей картины путей развития в данной области биотехнологии пока нет. Поэтому предлагаемая читателю книга под редакцией Вудворда очень актуальна. В ней собраны статьи, подготовленные наиболее видными учеными разных стран, работы которых по использованию иммобилизованных клеток получили повсеместное признание. В книге подробно рассмотрены пути изучения и применения иммобилизованных клеток. Особенность книги в том, что в каждой главе проблема не только разбирается теоретически, но приведены также прописи всех экспериментов, выполненных авторами. Таким образом, книга является не только учебным пособием по получению и применению катализаторов на основе иммобилизованных клеток, но и хорошим практическим руководством для выполнения эксперимента в данной области. Она представляет интерес для исследователей, работающих в области биотехнологии, а также студентов и аспирантов вузов химических и биологических специальностей. Введение и гл. 8, 9 переведены Е. В. Дайниченко, предисловие и гл. 1—6 Г. П. Самохиным. Гл. 7 была любезно предоставлена авторами К. А. Кошеченко и Г. В. Суходольской в виде рукописи.

И. В. Березин

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящая книга знакомит студентов и других возможных читателей с искусством иммобилизации ферментов и клеток. В ней детально рассмотрены используемые материалы, методы и аппаратура. Некоторые главы посвящены рассмотрению общих вопросов, другие — конкретному применению иммобилизованных ферментов и клеток. В настоящее время использованию биотехнологии для производства различных видов топлива и химических соединений (в том числе лекарств и гормонов) уделяется особое внимание, и в этом отношении применение иммобилизованных ферментов и клеток обладает большими потенциальными возможностями. Поэтому можно надеяться, что эта методическая книга в равной степени послужит интересам как производства, так и научных институтов и правительственных учреждений.

Я глубоко благодарен авторам глав, которые сделали эту книгу полезным справочным пособием. Я также хотел бы поблагодарить д-ра Элана Вайзмана, сотрудника Университета г. Сарри, который стимулировал мой интерес к иммобилизованным клеткам и ферментам. И наконец, я признателен м-с Дебби Вевер, сотруднице Национальной лаборатории в Ок-Ридже, за ее превосходную секретарскую работу.

Джонатан Вудворд

Примечание издательства

Издание этой книги частично финансировалось Управлением по фундаментальным исследованиям в энергетике министерства энергетики США в соответствии с условиями контракта № DE-AC05-84OR21400, заключенного с фирмой Martin Marietta Energy Systems, Inc.

СПИСОК АВТОРОВ

- S. P. Bidey
Department of Molecular Endocrinology, The Middlesex Hospital
Medical School, London, UK
- P. Brodelius
Institut für Biotechnologie, Zürich, Switzerland
- J. M. S. Cabral
Laboratório de Engenharia Bioquímica, Instituto Superior Técnico,
Universidade Técnica de Lisboa, Lisbon, Portugal
- M. Coughlan
Department of Biochemistry, University College, Galway, Eire
- G. de Olivera Neto
Instituto de Química, Cidade Universitaria, Universidade de São
Paulo, São Paulo, Brazil
- G. G. Guilbault
Department of Chemistry, University of New Orleans, New Orleans, USA
- I. J. Higgins
Cranfield Biotechnology Centre and Leicester Biocentre, Cranfield Institute
of Technology, Cranfield, Leicester, UK
- J. F. Kennedy
Department of Chemistry, University of Birmingham, Birmingham, UK
- M. P. J. Kierstan
Kerry Co-op Creameries Ltd., Ardfer, Eire
- H. E. Klei
Department of Chemical Engineering, University of Connecticut,
Storrs, USA
- К. А. Кошечко
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР,
г. Пущино, СССР
- D. Shim
Department of Chemical Engineering, University of Connecticut,
Storrs, USA
- Г. В. Суходольская
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР,
г. Пущино, СССР
- D. W. Sundstrom
Department of Chemical Engineering, University of Connecticut,
Storrs, USA
- L. B. Wingard, Jr.
Department of Pharmacology, University of Pittsburgh, Pittsburgh,
USA
- J. Woodward
Chemical Technology Division, Oak Ridge National Laboratory,
Oak Ridge, USA

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

сАМР	— циклический АМР
БСА	— бычий сывороточный альбумин
БЦ	— бромциан
ВДЭК	— вращающийся дисковый электрод с кольцом
ДМСО	— диметилсульфоксид
ДЭАЭ	— диэтиламиноэтил
ИК	— иммобилизованные клетки
ИМК	— 3-изобутил-1-метилксантин
КМ	— карбоксиметил
Кон А	— конканавалин А
КАС	— конканавалин А-сефароза
ЛГ	— лютеинизирующий гормон
МБА	— N,N'-метиленбисакриламид
NADP	— никотинамидадениндинуклеотидфосфат
н. к. э.	— насыщенный каломельный электрод
ГЭПЭС	— N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфокисли
ПВП	— поливинилпирролидон
ПВС	— поливиниловый спирт
ПЭГ	— полиэтиленгликоль
ПЭИ	— полиэтиленимин
ТЕМЭД	— N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
ТТГ	— тиреотропный гормон
FAD	— флавинадениндинуклеотид
ФДА	— флуоресцеиндиацетат
ФСГ	— фолликулостимулирующий гормон
ХГТЧ	— хорионический гонадотропин человека
ЭДТА	— этилендиаминтетраацетат

ВВЕДЕНИЕ

И. Дж. Хиггинс

В настоящее время в самых различных областях нашей жизни, от медицины до военной промышленности, от переработки пищевых продуктов до микроэлектронных сенсоров, ученые открывают все новые пути использования каталитических свойств и уникальной способности биологических систем к узнаванию. Во многих случаях разработка практических методов или приборов, включающих в качестве компонента биологический элемент, в большой степени зависит от наличия соответствующих методик, позволяющих стабилизировать и сохранять этот биологический элемент, будь то большая молекула или крошечная частица. Весьма подходящим для этих целей является метод иммобилизации.

Хотя данный метод применяется уже достаточно долго для получения разнообразной продукции, основанной на использовании биологических компонентов, например индикаторных лент с нанесенными на них ферментами, особенно бурно его технология развивалась в последние несколько лет. Значительно расширился набор способов сохранения активности биологических объектов, причем в разработке этих способов методы иммобилизации играют все большую роль. Например, при создании систем, соответствующих требованиям промышленного производства, можно изменять кинетические параметры, специфичность и стабильность биологических объектов. Таким образом, технология становится все более предсказуемой, или, другими словами, становится скорее наукой, чем искусством.

Методы иммобилизации приобретают все более важное значение в биотехнологии, и их развитие безусловно является лимитирующей стадией в некоторых областях биотехнологии. Несмотря на все вышеизложенное, очень многое в этих процессах остается невыясненным. Например, недавно в результате совместной работы ученых Кренфилдского биотехнологического центра и Оксфордского университета был создан новый тип амперометрических биосенсоров, в которых иммобилизованные оксидазы находятся в непосредственном электрохимическом контакте с поверхностью модифицированного углеродного электрода. Иммобилизация вместе с химической модификацией поверхности электрода приводит к значительным и весьма полезным изменениям кинетических параметров ферментов, и в результате электроны вместо взаимо-

действия с природным акцептором — молекулярным кислородом — переходят на электрод. На молекулярном уровне причины этого явления не совсем ясны.

Исследования в области иммобилизации ферментов и клеток чрезвычайно важны и по-видимому сохраняют свое значение в обозримом будущем. Развитие инженерной энзимологии и способов модификации клеток и микроорганизмов будет зависеть от результатов этих исследований все в большей и большей степени.

Настоящая книга освещает современное положение дел в области иммобилизации ферментов и клеток, причем особое внимание уделено практическим аспектам. В составлении глав, которые охватывают широкую область, приняли участие ведущие ученые. Книга будет весьма полезна как исследователям, так и тем, кто хотел бы получить детальную информацию по данному вопросу.

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ: АДСОРБЦИЯ И КОВАЛЕНТНОЕ ПРИСОЕДИНЕНИЕ

Джонатан Вудворд

1. Введение

Самый простой метод иммобилизации ферментов — это адсорбция на нерастворимом носителе, и ознакомление с иммобилизованными ферментами целесообразно начать именно с него. Процедура иммобилизации состоит в смешивании при подходящих условиях фермента и носителя, инкубации и отделении нерастворимого компонента смеси от растворимого центрифугированием или фильтрованием. Главный недостаток этого метода состоит в том, что фермент может связываться с носителем недостаточно прочно. Например, поскольку адсорбция ферментов на таком носителе, как ДЭАЭ-сефадекс, осуществляется главным образом за счет множественных солевых связей, на такого рода связи влияют даже незначительные изменения экспериментальных условий: pH, ионной силы, температуры и природы растворителя, что может приводить к десорбции фермента с носителя. Десорбцию фермента может вызывать также субстрат. Кроме солевых связей во взаимодействии фермента с носителем могут участвовать и другие слабые силы, например водородные или ван-дер-ваальсовы. Примеры носителей, используемых для адсорбции ферментов, приведены в табл. 1-1. В идеальном случае иммобилизация фермента не должна приводить к потере каталитической активности. Активность сохраняется, например, при иммобилизации β -глюкозидазы путем адсорбции на конканавалин А-сефарозе (КАС). Более подробно этот вопрос освещен в разделе «Обсуждение» работы [1]. Вообще говоря, адсорбция — мягкий метод иммобилизации, который, как правило, слабо влияет на каталитическую активность ферментов.

Метод иммобилизации ферментов с помощью ковалентного связывания основан на образовании химической связи между молекулами фермента и носителем. При этом важно, чтобы аминокислоты, необходимые для проявления каталитической активности ферментов, не участвовали в ковалентном связывании с носителем. Избежать этого, как правило, трудно, поэтому способ ковалентной иммобилизации обычно приводит к снижению ферментативной активности. Однако инактивацию фермента можно предотвратить, если проводить иммобилизацию в присутствии субстрата, который защищает активный центр. Типичные водонерастворимые носители, используемые для ковалентной иммобилизации

Таблица 1-1. Материалы, используемые для адсорбции ферментов

Оксид алюминия
Бентонит
Карбонат кальция
Гель фосфата кальция
Уголь
Целлюлоза
Глина
Коллаген
Конканавалин А-сефароза
Стекло пористое
Гидроксипатит
Ионообменные смолы
Каолин
Фенольные полимеры
Силикагель

ферментов, приведены в табл. 1-2. Для ковалентного присоединения носитель нужно предварительно активировать. Активированный носитель может реагировать с определенными группами молекулы фермента: α - и ε -аминогруппами остатков лизина, а также функциональными группами остатков тирозина, гистидина, аргинина и цистеина. Подробное описание методов ковалентной иммобилизации ферментов приведено ниже.

В этой главе нет полного описания всех методов иммобилизации ферментов путем адсорбции и ковалентного связывания. Более подробное рассмотрение этого вопроса, особенно в отношении теоретических аспектов, читатель найдет в обзорах [2—4]. Исчерпывающим образом методические аспекты обсуждаются в соответствующем томе *Methods in Enzymology*, который целиком посвящен иммобилизованным ферментам [5].

Цель данной главы — рассмотреть применение адсорбции и ковалентного связывания для иммобилизации ферментов на примере конкретных ферментов β -фруктофуранозидазы (инвертазы) и β -глюкозидазы (целлобиазы). Ниже будут описаны методики, использованные при иммобилизации, измерении активности и изучении свойств полученных препаратов. Эти методы применимы

Таблица 1.2. Материалы используемые для ковалентной иммобилизации ферментов

Агароза (сефароза)
Целлюлоза
Декстран (сефадекс)
Стекло
Сополимеры полиакриламида
Полиаминоэтирол

для большинства ферментов, но окончательный выбор метода диктуется свойствами конкретного фермента.

Ферменты β -фруктофуранозидаза (инвертаза) и β -глюкозидаза (целлобиаза) особенно подходят для ознакомления с иммобилизованными ферментами в первую очередь из-за их дешевизны и доступности. Они выпускаются промышленностью, и их препараты обычно предоставляются для исследовательских целей бесплатно. Например, коммерческий концентрат дрожжевой инвертазы (β -фруктофуранозидазы) можно запросить у фирмы Honeywill and Stein Co., Ltd., Wallington, Surrey, UK, а концентрированный препарат β -глюкозидазы 250L — у фирмы Novo Laboratories, Inc., Wilton, Connecticut, USA.

2. Адсорбция при помощи ионного связывания с ДЭАЭ- и КМ-сефадексом

2.1. Подготовка носителя

Одним из свойств ионообменных сефадексов является их способность набухать в водных растворителях. Степень набухания зависит от ионной силы среды, причем между этими параметрами существует обратная пропорциональная зависимость. Перед адсорбцией сефадексы дают возможность набухнуть в подходящем буфере, а затем добавляют фермент. Выбор буфера определяется свойствами фермента, который иммобилизуют. Так, например, инвертазу пекарских дрожжей можно адсорбировать на анионообменнике ДЭАЭ-сефадекс А-50, которому предварительно дали набухнуть или уравновеситься в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,0 [6]. Для набухания к 0,5 г сухого ДЭАЭ-сефадекса А-50 добавляют 100 мл 10 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,0, и оставляют на 3 дня при комнатной температуре. За это время носитель полностью набухает. Если увеличить температуру до 90 °С, то набухания можно достичь за несколько часов. Эту же методику можно использовать для иммобилизации фермента на катионообменнике КМ-сефадекс С-50, но в этом случае для уравнивания берут 10 мМ натрий-ацетатный буфер, рН 3,6. Следует обратить внимание на то, что для адсорбции ферментов нужно использовать буферные растворы с низкой ионной силой, иначе эффективность адсорбции будет понижаться из-за предпочтительной по сравнению с белковыми ионами адсорбции противоионов буфера.

2.2. Адсорбция инвертазной активности

2.2.1. Определение активности свободной или растворимой инвертазы

Для определения количества фермента, иммобилизованного на носителе, обычно измеряют ферментативную активность исходного раствора, который инкубировали с носителем, и активность, остающуюся в растворе после завершения процесса иммобилизации. Разность между этими активностями соответствует теоретическому или максимальному количеству иммобилизованного фермента. Для определения активности инвертазы 0,1 мл исследуемого раствора разбавляют до подходящей концентрации, смешивают с 0,4 мл раствора сахарозы (50%, вес/объем) и 1,5 мл 0,1 М натрий-ацетатного буфера, pH 4,7, и инкубируют при 25 °C. Через определенное время отбирают 0,1 мл реакционной смеси и измеряют в ней содержание глюкозы, используя какой-либо коммерческий набор реактивов. Все разбавления делают тем же буферным раствором, в котором проводили реакцию. Одна единица активности определяется как количество фермента, способное гидролизовать 1 мкмоль сахарозы за 1 мин в указанных условиях. Коммерческий препарат инвертазы, описанный в этой главе (Nouywill and Stein), имеет активность 4000 ед./мл.

2.2.2. Связывание фермента с носителем

Получение сефадекс-инвертазных комплексов описано в табл. 1-3 и сводится в основном к перемешиванию суспензий. Методики такого типа широко применяются в лабораторной практике.

Таблица 1-3. Получение комплекса сефадекса — инвертаза

1. Добавить по 0,1 мл коммерческого препарата инвертазы (примерно 400 ед. активности) к каждому 10 мл сефадекса, уравновешенного разными буферными растворами (сухой вес носителя 50 мг).
2. Перемешивать суспензии при комнатной температуре в течение 30 мин, осторожно переворачивая пробирку или пользуясь магнитной мешалкой.
3. Отцентрифугировать комплексы сефадекса — инвертаза в настольной центрифуге, слить супернатант и ресуспендировать комплексы в соответствующих буферных растворах, использованных для уравновешивания. Повторить стадии центрифугирования и ресуспендирования несколько раз, пока в супернатанте не исчезнет активность инвертазы. Это свидетельствует о полном удалении несвязавшегося фермента.
4. Ресуспендировать комплексы в соответствующих буферах для уравновешивания (общий объем 10 мл).

2.2.3. Активность адсорбированной инвертазы и стабильность связи фермент — носитель

Активность адсорбированного фермента измеряют точно так же, как и свободного, т. е. берут 0,1 мл комплекса инвертазы — сефадекс и определяют ферментативную активность по описанной выше процедуре. Частицы сефадекса довольно малы, так что для работы с их суспензией можно использовать стандартные стеклянные пипетки или пластиковые наконечники для автоматических пипеток. Однако было обнаружено, что эти частицы могут прилипать к стенкам пипетки или пластикового наконечника. Практически полного удаления или по крайней мере удаления большей части частиц со стенок можно добиться многократным промыванием пипетки или наконечника реакционной смесью.

Так как оптимум активности дрожжевой инвертазы достигается при pH 4,7, важно установить, не десорбируется ли фермент, который был иммобилизован при pH 7,0 или pH 3,6, при определении активности. Иными словами, требуется определить, достаточно ли стабильна связь фермент — носитель, поскольку известно, что адсорбция белков на ионообменных смолах чувствительна к изменениям pH.

В табл. 1-4 приведены измеренные в pH-оптимуме активности препаратов инвертазы, которая была адсорбирована на ДЭАЭ- и КМ-сефадексах. Данные этой таблицы позволяют предположить, что фермент прочно связан с носителем при определении активности и что измеряемая активность — это действительно активность иммобилизованного фермента. Однако оказалось, что это предположение верно для фермента, связанного с ДЭАЭ-сефадексом, но не с КМ-сефадексом (табл. 1-5). Кажущиеся высокие значения ферментативной активности, адсорбированной на КМ-сефадексе (табл. 1-4, столбец 6), могут быть следствием десорбции примерно половины фермента с носителя при pH 4,7, и, следовательно, измеряемая суммарная активность не является истинной активностью иммобилизованного фермента.

Истинные свойства адсорбированного фермента, включая его

Таблица 1-4. Получение инвертазы, адсорбированной на ДЭАЭ- и КМ-сефадексе

Носитель	Количество добавленной инвертазы, ед.	Количество инвертазы в промывных растворах, ед.	Количество связанной инвертазы (A) ед.	Активность комплекса (B), ед.	В/А, %
ДЭАЭ-сефадекс	400	0	400	164	41
КМ-сефадекс	400	100	300	210	70

Таблица 1-5. Элюирование активности инвертазы с ДЭАЭ-сефадекса и КМ-сефадекса буферами с разным значением рН ¹⁾

рН буфера ²⁾	Элюированная активность, ед.		рН буфера ²⁾	Элюированная активность, ед.	
	ДЭАЭ-сефа- декс	КМ-сефа- декс		ДЭАЭ-сефа- декс	КМ-сефа- декс
2,5	13	0	5,6	0	21
3,6	0	0	6,0	0	19
4,0	0	0	7,0	0	22
4,7	0	16			

¹⁾ 13 и 34 ед. активности комплексов ДЭАЭ-сефадекс — инвертаза и КМ-сефадекс — инвертаза соответственно встряхивали в течение 5 мин при комнатной температуре (18 °С) в 1,9 мл буфера и затем определяли активность элюата.

²⁾ Состав буферов: 10 мМ глицин-HCl, рН 2,5; 10 мМ ацетат натрия, рН 3,6, 4,0, 4,7, 5,6; 10 мМ фосфат натрия, рН 6,0, 7,0.

активность, могут быть измерены только в условиях, когда не происходит десорбции фермента (соответствующие рН, температура, ионная сила, концентрации субстрата и продукта реакции). Установлено, что в 10 мМ натрий-ацетатном буфере, рН 4,7, инвертаза, адсорбируемая на ДЭАЭ-сефадексе, прочно связана с носителем, т. е. при этих условиях определяется активность адсорбированного фермента. Обычно желательно знать следующие свойства адсорбированного фермента: рН-оптимум, рН-стабильность, температурный оптимум, термостабильность и K_m .

В качестве примера рассмотрим определение прочности связывания фермента в присутствии субстрата.

1. 0,5 мл суспензии адсорбированного фермента (8,2 ед., табл. 1-3) добавляют к 9,5 мл 10 мМ натрий-ацетатного буфера, рН 4,7, содержащего известную концентрацию сахарозы.

2. Концентрацию субстрата используют в интервале от 0,05 до 0,3 М (K_m дрожжевой инвертазы ~ 30 мМ). Смесь инкубируют в течение различного времени при комнатной температуре. Очевидно, «комнатная температура» варьирует в зависимости от географического положения лаборатории.

3. Через определенное время суспензию, содержащую адсорбированный фермент и сахарозу, центрифугируют, осторожно удаляют супернатант (стараясь не взмутить осадок), промывают осадок несколько раз буфером для удаления сахарозы и ресуспендируют его в буфере. После этого определяют ферментативную активность адсорбированного фермента.

Описанный метод может быть применен и для решения более общей задачи: установить, при каких условиях происходит десорбция фермента.

3. Адсорбция ферментов на аффинных носителях

3.1. Носители аффинного типа

Носители аффинного типа — это адсорбенты, обладающие сродством по отношению к группе родственных соединений (табл. 1-6). Они доступны в виде коммерческих уже иммобилизованных препаратов, в которых они ковалентно присоединены к различным типам сефарозы, представляющей собой сферические частицы геля агарозы. Так, например, конканавалин А-сефароза представляет собой конканавалин А (Кон А), связанный с сефарозой 4В бромциановым методом (разд. 4). Кон А — это лектин (белок, способный обратимо взаимодействовать со специфическими остатками сахаров), который связывает маннозу, глюкозу и стерически родственные остатки. Таким образом, Кон А-сефароза может быть использована для очистки гликопротеинов, содержащих эти сахара. Гликоферменты, содержащие остатки маннозы и глюкозы, могут быть иммобилизованы адсорбцией на Кон А-сефарозе.

Таблица 1-6. Носители аффинного типа и их специфичность ¹⁾

Носитель	Специфичность
Белок А-сефароза CL-4В Кон А-сефароза	Fc-Область IgG и родственных молекул Концевые α-D-глюкопиранозильные, α-D-маннопиранозильные или стерически сходные с ними остатки
Чечевичный лектин-сефароза 4В	Аналогична специфичности Кон А-сефарозы, но аффинность по отношению к индивидуальным сахарам ниже
Сефароза 6MB с иммобилизованным лектином из проростков пшеницы	N-Ацетил-D-глюкозамин
Poly (U)-сефароза 4В	Нуклеиновые кислоты, особенно мРНК, содержащие poly (A)-последовательности; poly (U)-связывающие белки
Poly (A)-сефароза 4В	Нуклеиновые кислоты и олигонуклеотиды, содержащие poly (U)-последовательности; РНК-специфичные белки
Лизин-сефароза 4В	Плазминоген; рибосомная РНК
Голубая сефароза CL-6В	Широкий спектр ферментов, имеющих нуклеотидные кофакторы; сывороточный альбумин и др.
5'-AMP-сефароза 4В	Ферменты, использующие в качестве кофактора NAD ⁺ , и АТР-зависимые киназы
2',5'-ADP-сефароза 4В	Ферменты, использующие в качестве кофактора NADP ⁺

¹⁾ Приведены данные из инструкции «Аффинная хроматография, принципы и методы», выпущенной фирмой Pharmacia Fine Chemicals.

Хорошими кандидатами для адсорбции на Кон А-сефарозе являются ферменты инвертазы и целлобиазы, которые представляют собой гликопротеины [7, 8].

3.2. Подготовка носителя и присоединение к нему целлобиазы

Коммерческая Кон А-сефароза представляет собой суспензию в 0,1 М ацетатном буфере, pH 6,0, содержащем 1 М NaCl, 10^{-3} М $MnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$ и 0,01% мертиолат в качестве антибактериального агента. Для связывания гликопротеинов с Кон А требуется присутствие ионов Mn^{2+} и Ca^{2+} . Тем не менее при нейтральных значениях pH комплексы гликопротеин — Кон А стабильны и в

Таблица 1-7. Иммунизация целлобиазы на Кон А-сефарозе

1. Отобрать необходимый объем равномерно перемешанной суспензии Кон А-сефарозы, тщательно промыть носитель 10 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0,5 М NaCl и 1 мМ $CaCl_2$, и ресуспендировать его в этом буфере в исходном объеме.
2. Перемешивать в течение 30 мин 5 мл раствора целлобиазы, разбавленной в 100 раз 10 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7,4, с 5 мл суспензии Кон А-сефарозы (КАС) при комнатной температуре ($\sim 20^\circ C$).
3. Отфильтровать комплекс КАС-фермент через фильтр из пористого стекла со средним размером пор. Промывать комплекс КАС-фермент на фильтре 10 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 4,8, содержащим 1 мМ $CaCl_2$ и 1 мМ $MnCl_2$ (порциями буфера по 10 мл), пока в промывных водах не перестанет обнаруживаться активность фермента.
4. Ресуспендировать комплекс КАС-фермент в 10 мл буфера (pH 4,8, содержит Ca^{2+} и Mn^{2+}).

отсутствие экзогенных Mn^{2+} и Ca^{2+} . При значениях pH ниже 5 реакционная смесь должна содержать эти катионы для поддержания связывающих свойств Кон А. Методика, используемая для иммобилизации целлобиазы на Кон А-сефарозе приведена в табл. 1-7. В данном случае использовали препарат целлобиазы в виде концентрированного и очень вязкого раствора, выпускаемый фирмой Novo Enzymes.

3.2.1. Определение активности свободной, или растворимой, целлобиазы

0,1 мл концентрированного раствора фермента, разбавленного в 200 раз 10 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 5,0, добавляют к 4,9 мл этого буфера, содержащего 10 мМ целлобиозу. Регистрируют образование глюкозы при $30^\circ C$, которое в течение первых 30 мин подчиняется линейной зависимости. 1 ед. целлобиазы соответствует количеству фермента, необходимому для об-

разования 1,0 мкмоль глюкозы в 1 мин при 30°C. При этих условиях активность целлюбиазы составляет 3,6 ед. на 1 мл разбавленного фермента.

3.2.2. Активность адсорбированной целлюбиазы и стабильность связи фермент — носитель

Активность комплекса Кон А-сефароза — целлюбиаза измеряют таким же способом, как и в случае свободного фермента, используя 0,1 мл суспензии комплекса. Частицы сефарозы прилипают к стенкам пипеток и наконечников, поэтому для полного переноса частиц пипетки и наконечники нужно несколько раз сполоснуть реакционной смесью.

Адсорбция гликопротеина целлюбиазы на аффинном носителе Кон А, зависит от взаимодействия между молекулой Кон А и остатками сахаров, ковалентно связанными с молекулой фермента. Поэтому необходимо установить, не вызывает ли субстрат (целлюбиаза) или продукт (глюкоза) десорбцию фермента с носителя, поскольку оба соединения являются сахарами, а глюкоза связывается с Кон А. Это делают следующим образом.

1. 0,5 мл суспензии комплекса Кон А-сефароза — целлюбиаза добавляют к 4,5 мл 10 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 4,8, содержащего 1 мМ Ca^{2+} и 1 мМ Mn^{2+} , а также целлюбиозу или глюкозу в конечной концентрации 0,1 М или 0,5 М соответственно.

2. Инкубируют смесь при комнатной температуре или при 50°C 1 ч.

3. Смесь центрифугируют, осторожно отбирают супернатант, стараясь не захватить осадок, промывают осадок тем же буфером, который использовали для инкубации, для удаления глюкозы и целлюбиазы.

4. Осадок ресуспендируют в 0,5 мл того же буфера и определяют его активность описанным выше методом.

Мы установили, что при указанных выше концентрациях глюкозы и целлюбиозы десорбции фермента не происходит [1—9]. Этот факт весьма важен, так как он означает, что целлюбиаза будет оставаться прочно связанной с Кон А-сефарозой в присутствии высоких концентраций субстрата и продукта. Аналогичным

Таблица 1-8. Получение целлюбиазы, адсорбированной на Кон А-сефарозе

Количество добавленной целлюбиазы, ед.	Количество целлюбиазы в промывных водах, ед.	Количество связанной целлюбиазы (А), ед.	Активность комплекса (В), ед.	В/А, %
18	0	18	20	111

образом мы установили, что целлобиаза не десорбируется с носителя при значениях pH от 3,5 до 7,4 [9].

В табл. 1-8 показано, что адсорбция целлобиазы на Кон А-сефарозе происходит без потери активности. По-видимому, в отличие от адсорбции на ионообменных смолах в адсорбционных взаимодействиях на Кон А-сефарозе не участвует белковая часть молекулы фермента, в которой находится его активный центр, и поэтому процедура иммобилизации не сказывается на активности фермента.

4. Ковалентное присоединение к сефарозе, целлюлозе и полиакриламиду

Для ковалентного связывания фермента с такими носителями, которые приведены в табл. 1-2, требуется, чтобы носитель был активирован, благодаря чему стало бы возможным его химическое связывание с ферментом. Примером такого метода иммобилизации может служить ковалентное присоединение целлобиазы к сефарозе и инвертазы к целлюлозе и полиакриламиду.

4.1. Присоединение целлобиазы к сефарозе, активированной бромцианом

Широко распространенным способом иммобилизации является ковалентное связывание ферментов с сефарозой, активированной бромцианом (БЦ). Этот носитель доступен в виде коммерческого препарата, и иммобилизацию фермента на нем можно проводить, минуя стадию предварительной активации. Мы не приводим здесь методики получения БЦ-сефарозы; с ней можно познакомиться в работе [5]. Активация сефарозы основана на реакции между БЦ и гидроксильными группами носителя. Образующиеся в результате этого имидокарбонатные группы могут реагировать со свободными аминогруппами фермента.

Целлобиазу присоединяют к носителю либо через аминогруппы белковой части молекулы, либо через остатки углеводов, так

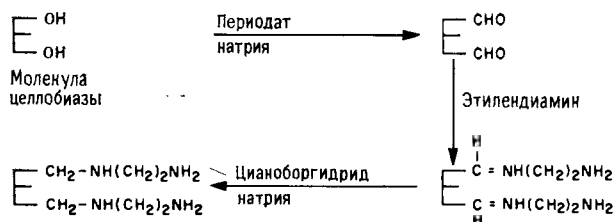


Рис. 1-1. Аминоалкилирование боковых углеводных цепей целлобиазы.

Таблица 1-9. Ковалентная иммобилизация целлюбиазы на сефарозе, активированной бромцианом

1. 5 г сефарозы, активированной бромцианом, поместить на фильтр из пористого стекла. Дать гелю набухнуть, промывая его 1 л 10^{-3} н. HCl, и, наконец, тщательно промыть гель 0,1 М NaHCO₃, pH 8,3, содержащим 0,5 М NaCl. 1 г сухого носителя при набухании дает 3,5 мл геля.
2. 1 мл целлюбиазы, разбавленной дистиллированной водой в 10 раз, обработать метапериодатом натрия (конечная концентрация 0,02 М) в течение 1 ч при комнатной температуре ($\sim 23^\circ\text{C}$) в темноте.
3. Остановить реакцию добавлением 1 мл 0,36 М этиленгликоля.
4. Тщательно диализовать раствор против дистиллированной воды в течение 7 ч при 4°C и затем добавить равный объем 0,1 М натрий-фосфатного буфера, pH 6,0, содержащего 0,2 мг/мл цианоборгидрида натрия и 0,1 М этилендиамина. Оставить смесь на ночь при 4°C .
5. Удалить избыток реагентов диализом против 10 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 4,8, при 4°C ¹⁾.
6. Присоединить аминоалкилированные боковые углеводные цепи целлюбиазы к CNBr-сефарозе. Для этого смешать 0,6 мл раствора модифицированного фермента с 2,4 мл набухшей CNBr-сефарозы в 0,1 М NaHCO₃, pH 8,3. Перемешивать в течение ночи при 4°C .
7. Отфильтровать комплекс фермент — сефароза, тщательно промыть его 10 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 4,8, и ресуспендировать в этом же буфере. В течение этой процедуры регистрировать ферментативную активность в промывных водах.

¹⁾ Механизм реакции изображен на рис. 1-1.

как она представляет собой гликопротеин (табл. 1-9). Однако при ковалентной иммобилизации гликопротеинов возможны осложнения, поскольку углеводные остатки могут блокировать доступ боковых аминокислотных цепей, содержащих свободные аминокислотные группы, к активированным группам носителя [10]. Иммобилизация через углеводную часть почти не влияет на ферментативную активность, поскольку при этом практически не затрагивается белковая часть молекулы фермента, содержащая активный центр, тогда как иммобилизация через белковую часть обычно приводит к снижению ферментативной активности.

Следует также отметить, что аминоалкилирование фермента может приводить к потере активности. В случае целлюбиазы те-

Таблица 1-10. Получение аминоалкилированной целлюбиазы, иммобилизованной на CNBr-сефарозе

Количество добавленной целлюбиазы, ед.	Количество целлюбиазы в промывных водах, ед.	Количество связанной целлюбиазы (А), ед.	Активность комплекса (В), ед.	В/А, %
4	0	4	3,2	81

ряется 33% исходной активности [9]. Результаты получения аминоалкилированной целлюбиазы, ковалентно связанной с БЦ-сефазарой, приведены в табл. 1-10.

4.2. Присоединение инвертазы к микрокристаллической целлюлозе

Этот метод основан на активации природных носителей (например, целлюлозы) солями переходных металлов (например, хлоридом титана), которые доступны как коммерческие препараты фирмы BDH (Великобритания) и Aldrich Chemical Company (США). Иммобилизация биокатализаторов с помощью металлохелатного связывания детально обсуждается в гл. 2, а подробная методика приведена в табл. 1-11.

Следует обратить особое внимание на равномерность суспендирования комплекса микрокристаллическая целлюлоза — фермент перед отбором пробы для определения активности. Фермент, адсорбированный на целлюлозе и не связанный с ней ковалентно, может быть удален промыванием комплекса буфером, содержащим 1,0 М NaCl. Результаты получения инвертазы, ковалентно связанной с микрокристаллической целлюлозой, приведены в табл. 1-12.

Таблица 1-11. Ковалентная иммобилизация инвертазы на целлюлозе

1. Провести активацию 0,5 г микрокристаллической целлюлозы. Для этого целлюлозу перемешивать (переворачиванием пробирки) в 10 мл 15%-ного (вес/объем) хлорида титана в течение 3 ч при комнатной температуре.
2. Тщательно промыть носитель 10 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 4,7, и ресуспендировать его в 9,6 мл этого же буфера. Тип и pH буфера зависит от свойств фермента, который предполагается иммобилизовать.
3. Добавить 0,4 мл коммерческого препарата инвертазы к 9,6 мл суспензии активированного носителя и перемешивать при 4°C в течение ночи вращением пробирки вокруг ее оси в горизонтальном положении.
4. Отцентрифугировать комплекс фермент — носитель, удалить супернатант, комплекс тщательно промыть буфером с pH 4,7 и ресуспендировать в этом же буфере (конечный общий объем 10 мл).

Таблица 1-12. Получение инвертазы, иммобилизованной на микрокристаллической целлюлозе

Количество добавленной инвертазы, ед.	Количество инвертазы в промытых водах, ед.	Количество связанной инвертазы (A), ед.	Активность комплекса (B), ед.	В/А, %
1600	1000	600	275	46

4.3. Присоединение инвертазы к полиакриламиду

К полиакриламидным носителям, доступным в виде коммерческих препаратов, относятся носители типа энзакрил, производимые фирмой Koch-Light Laboratories, Ltd. (Великобритания). Они представляют собой сополимеры акриламида и различных производных акриламида. В качестве примера можно привести энзакрилы АА и АН, содержащие ароматические и гидразидные остатки соответственно. После активации они способны ковалентно связывать белки, как изображено на рис. 1-2.

4.3.1. Иммобилизация коммерческого препарата инвертазы на энзакрипах АА и АН

Методика иммобилизации приведена в табл. 1-13. Энзакрилы АА и АН хорошо связывают инвертазу: соответственно 64% и 46% исходной ферментативной активности, но в результате связывания активность фермента теряется [11]. Причины полной инактивации фермента неизвестны. Однако маловероятно, что такая инактивация — общее явление, характерное для всех ферментов, которые иммобилизованы на этих носителях; скорее всего описанную методику можно использовать и для других ферментов.

5. Свойства адсорбированных и ковалентно связанных ферментов

С практической точки зрения иммобилизация ферментов на водонерастворимых носителях очень выгодна, поскольку после завершения ферментативной реакции иммобилизованный фермент может быть выделен и использован повторно. Однако необходи-

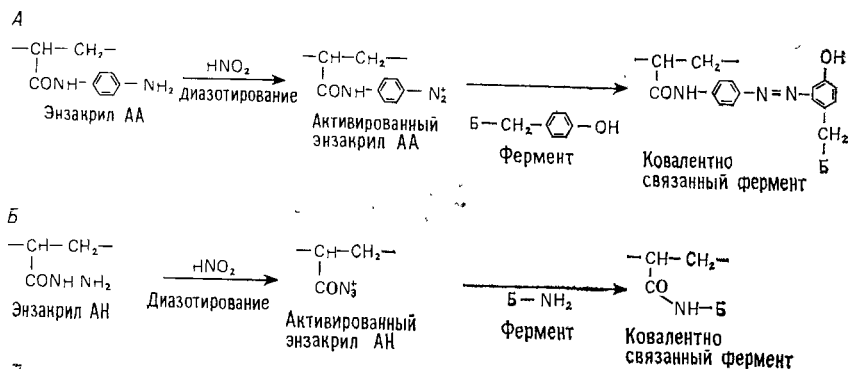


Рис. 1-2. Активация носителей энзакрила АА и АН с последующим ковалентным связыванием белка (Б).

Таблица 1-13. Ковалентная иммобилизация инвертазы на полиакриламиде

1. 100 г энзакрила АА или АН перемешивать в 5 мл 2 н. HCl при 4 °C в течение 15 мин (перемешивание вести вращением пробирки вокруг ее оси в горизонтальном положении).
2. Добавить 4 мл 2%-ного (вес/объем) нитрита натрия, предварительно охлажденного во льду, и продолжать перемешивание в течение еще 20 мин.
3. Тщательно промыть диазотированный энзакрил АА или АН 10 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 8,0, или 10 мМ натрий-карбонатным буфером, pH 9,2, соответственно и ресуспендировать носитель в 9,9 мл соответствующего буфера.
4. Добавить 0,1 мл коммерческого препарата инвертазы к 9,9 мл суспензии активированного носителя и перемешивать в течение 48 ч при 4 °C.
5. Отцентрифугировать суспензию и удалить супернатант. Ресуспендировать осадок в 10 мл 10 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 4,7, содержащего 1 М NaCl, и энергично встряхивать в течение 5 мин при комнатной температуре.
6. Ресуспендировать комплекс фермент — носитель в 10 мл буфера, pH 4,7, и определить ферментативную активность в аликвоте суспензии.

мо знать, остается ли иммобилизованный фермент связанным с носителем при различных условиях (pH, температура, присутствие субстрата и продуктов), используемых для наиболее полного выделения фермента. Убедившись в прочности связывания фермента с носителем, можно сравнивать свойства свободного и иммобилизованного фермента.

5.1. Максимальная «нагрузка» носителя

Под максимальной «нагрузкой» носителя ферментом подразумевается максимальное количество фермента, которое может быть иммобилизовано на определенном количестве носителя. Это очень важный параметр, поскольку высокая степень нагрузки

Таблица 1-14. Максимальное связывание целлюлазы с КАС¹⁾

Номер эксперимента	Количество добавленной целлюлазы (А)		Количество целлюлазы в промывных растворах (В)		Активность иммобилизованного фермента (С)		Активность C/(A-B), %
	ед.	мг белка	ед.	мг белка	ед. ²⁾	ед./г КАС	
1	18	1	0	0,3	20	51	111
2	180	10	0	2,8	216	531	120
3	900	50	219	42,1	765	1880	112
4	1800	100	905	86,8	834	2050	93

¹⁾ Перепечатано из работы [4] с разрешения издательства. Авторские права принадлежат издательству John Wiley and Sons, Inc., 1983.

²⁾ Количество единиц активности в 10 мл суспензии КАС.

носителя позволяет уменьшить размеры реактора. Пример определения максимальной «нагрузки» (или емкости носителя) приведен в табл. 1-14 для иммобилизации целлюлазы на Кон А-сефарозе. В этой таблице показано, что количество целлюлазы, связанной с суспензией Кон А-сефарозы (разд. 3), может быть увеличено в несколько раз, если увеличить исходное количество фермента, взятого для иммобилизации. Таким образом, емкость носителя по отношению к целлюлазной активности составляет 83,4 ед./мл или 2050 ед./г сухой Кон А-сефарозы. Следует также определить, не уменьшается ли специфическая активность (ед./мг связанного белка) при увеличении нагрузки носителя ферментом. Для этого измеряют количество белка, связанного с носителем, и его ферментативную активность. Сильное уменьшение удельной активности при больших количествах связанного белка свидетельствует о снижении эффективности действия фермента. Причиной этого может быть предпочтительная по сравнению с ферментом иммобилизация других белков, присутствующих в препарате, или же уменьшение доступности носителя для молекул фермента по мере заполнения носителя белком. Из данных, приведенных в табл. 1-14, видно, что максимальная удельная активность целлюлазы на КАС наблюдается при значении нагрузки 1880 ед./г.

5.2. Кинетические параметры иммобилизованных ферментов

Свойства иммобилизованных ферментов изучают, измеряя влияние pH, температуры, ионной силы, концентраций субстрата и продукта на кинетические параметры ферментативной реакции и сравнивая их с аналогичными результатами, полученными для нативного фермента. Измерения должны проводиться одинаковым образом для свободного и иммобилизованного ферментов. Если эксперимент проводят «в объеме» (т. е., фермент просто инкубируют в пробирке с субстратом), то скорости реакции со свободным и иммобилизованным ферментом будут определены фактически при разных условиях.

Изменение отдельных свойств фермента при иммобилизации в ряде случаев можно предсказать, в частности, при адсорбции фермента на заряженном носителе. Если носитель заряжен отрицательно или положительно, то pH-зависимости активности и стабильности адсорбированного фермента могут смещаться в более щелочную или кислую области соответственно. Это смещение объясняется изменением свойств микроокружения фермента в непосредственной близости от заряженного носителя. Такой эффект наблюдается, например, при иммобилизации дрожжевой инвертазы на ДЭАЭ- и КМ-сефадексах (рис. 1-3).

Иммобилизация фермента может приводить к увеличению или уменьшению K_m . Уменьшение K_m фермента при иммобилизации

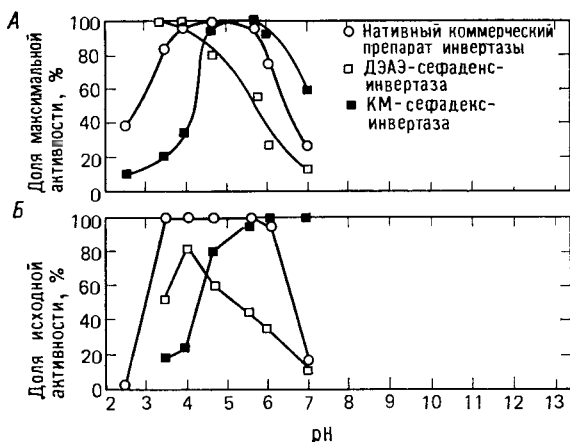


Рис. 1-3. Влияние pH на активность (А) и стабильность (Б) комплексов ДЭАЭ- и КМ-сефадекса с инвертазой.

(конечное значение называют кажущейся величиной K_M) может давать дополнительные практические преимущества, поскольку при низких концентрациях субстрата скорость реакции будет выше, чем в случае свободного фермента. Увеличение K_M , напротив, означает, что для достижения данной скорости реакции требуется большая концентрация субстрата, чем для свободного фермента. Изменения K_M могут объясняться также изменением свойств микроокружения частиц иммобилизованного фермента. Так, например, эти частицы окружает неперемешиваемый слой растворителя (слой Нернста), в котором концентрация субстрата ниже, чем в основной массе раствора. Следовательно, для насыщения иммобилизованного фермента требуется более высокая концентрация субстрата. Этот эффект проявляется в уменьшении кажущейся величины K_M при уменьшении размера частиц, на которых иммобилизован фермент, или при увеличении скорости перемешивания. Ионная природа носителя также может оказывать влияние на K_M , в частности если субстрат тоже заряжен. Если заряды носителя и субстрата противоположны, то кажущаяся величина K_M будет уменьшаться, а если они одноименны, то эта величина будет увеличиваться. Другие случаи увеличения или уменьшения K_M объяснить более сложно. Кажущиеся значения K_M для инвертазы и целлюбиазы, иммобилизованных на различных носителях, приведены в табл. 1-15.

Предполагают, что после иммобилизации фермента на носителе его термостабильность увеличится и, следовательно, его действие будет пролонгировано. Однако заранее трудно предсказать,

Таблица 1-15. Кажущиеся значения K_M препаратов иммобилизованной инвертазы и целлюлазы ¹⁾

Тип носителя	Инвертаза	Целлюлаза
Свободный фермент без носителя	28,0	2,7
Кон А-сефароза	28,5	1,7
Микрокристаллическая целлюлоза	28,5	1,1
CNBr-сефароза	—	1,2
KM-сефадекс	100,0	—

¹⁾ Значения K_M выражены в ммоль/л [1].

даст ли такой эффект данный конкретный метод иммобилизации. Влияние температуры на активность фермента изучают, измеряя начальную скорость ферментативной реакции при различных температурах. Увеличение температурного оптимума иммобилизованного фермента не обяза-

тельно означает увеличение термостабильности. Хотя после иммобилизации температурный оптимум фермента может увеличиться на 10—20°C, при высокой температуре он может быть очень лабилен и может быстро терять свою активность, хотя начальная скорость реакции при этом возрастает. Термостабильность измеряют двумя способами: 1) предварительной инкубацией фермента при повышенной температуре в течение различных промежутков времени с последующим охлаждением и измерением активности; 2) инкубацией фермента с субстратом при определенной температуре и регистрацией превращения субстрата в продукт.

Оба способа проиллюстрированы на рис. 1-4. Как видно из представленных данных, инвертаза, адсорбированная на КАС или ковалентно связанная с микрокристаллической целлюлозой, имеет повышенную ста-

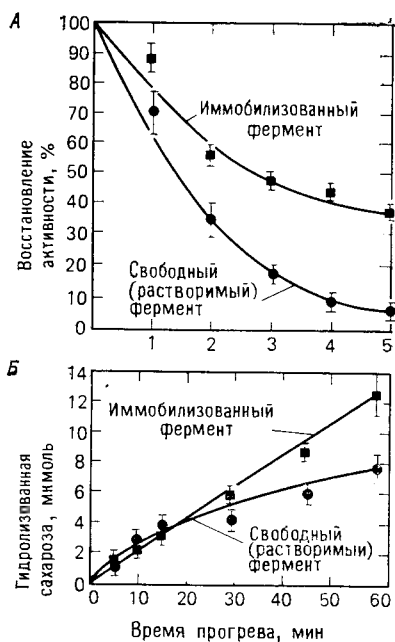


Рис. 1-4. Термостабильность при 65°C растворимой инвертазы и иммобилизованной на Кон А-сефарозе в отсутствие (А) и в присутствии (Б) 0,12 М сахарозы.

Бильность по сравнению с нативным ферментом. Данные на рис. 1-4, Б свидетельствуют о том, что в режиме функционирования иммобилизованный фермент еще более стабилен, чем нативный. Такого рода данные более информативны с практической точки зрения, чем те, что представлены на рис. 1-4, А.

Благодарность

Мне хотелось бы поблагодарить Д. Дж. Вевер за секретарскую помощь. Эта работа частично финансировалась the Office of Basic Energy Sciences, Department of Energy в соответствии с условиями контракта № DE-AC05-84OR21400, заключенного с фирмой Martin Marietta Energy Systems, Inc.

Литература

1. Lee J. M., Woodward J. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2441 (1983).
2. Zaborsky O. In: *Immobilized Enzymes*, CRC Press Cleveland, Ohio, 1973.
3. Barker S. A., Kay I. In: *Handbook of Enzyme Biotechnology* (Wiseman A., ed.), p. 89, Ellis Horwood, Chichester, 1975.
4. Goldstein G., Manecke G. In: *Immobilized Enzyme Principles* (Wingard L. B., Jr., Katchalski-Katzir E. and Goldstein L., eds.), p. 23, Academic Press, New York, 1976.
5. *Methods in Enzymology* (Moshbach K., ed.), vol. 46, Academic Press, New York, 1976.
6. Woodward J., Wiseman A. *Biochim. Biophys. Acta*, 527, 8 (1978).
7. Woodward J., Wiseman A. In: *Developments in Food Carbohydrate-3* (Lee C. K. and Lindley M. G., eds.), p. 1, Applied Science Publishers, Ltd., Barking, 1982.
8. Woodward J., Wiseman A. *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 73 (1982).
9. Woodward J., Wohlpert D. L. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 32, 547 (1982).
10. Hsiao H.-Y., Royer G. P. *Arch. Biochem. Biophys.*, 198, 379, (1979).
11. Woodward J. Ph. D. Thesis, University of Surrey (1977).

ИММОБИЛИЗАЦИЯ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ МЕТАЛЛОХЕЛАТНЫМ МЕТОДОМ

Джон Ф. Кеннеди и Иоаким М. А. Кабрал

1. Введение

Общий принцип присоединения биологически активных молекул к нерастворимому носителю весьма прост: необходимо поддерживать условия, в которых ферменты, антитела, антигены и др. функционируют в природе, причем ферменты могут быть связаны с поверхностью клеток, находиться внутри нее или в составе биологических мембран и тканей.

Ни один из существующих методов иммобилизации биологически активных молекул не является универсальным. При связывании биологически активной молекулы с нерастворимым носителем следует избегать способов присоединения, которые приводят к потере ее активности за счет модификации активного центра. Нельзя также перенасыщать носитель связанными молекулами, так как это может привести к тесному сближению молекул и к уменьшению активности фермента за счет стерических затруднений при взаимодействии субстрата с активным центром. Однако ограниченная «нагрузка» носителя отнюдь не гарантирует успех, поскольку не исключено взаимодействие между иммобилизованными и свободными молекулами фермента за счет гидрофобных сил и образования водородных связей, которое может приводить к блокированию свободными молекулами пространства между связанными молекулами фермента. В каждом случае следует принимать во внимание и способ присоединения, и природу носителя. Методы иммобилизации ферментов, клеток, антигенов, антител, нуклеиновых кислот, антибиотиков, а также свойства полученных препаратов рассмотрены в обзорах [1, 2].

Наилучшим способом иммобилизации считают образование ковалентных связей между молекулой и носителем. Однако этот способ, как правило, требует предварительной активации носителя, длительной инкубации для завершения реакции присоединения и специальных условий. Нам же хотелось подыскать метод, в котором не требовалось бы дополнительной модификации носителя, а иммобилизация протекала бы быстро и в достаточно обычных условиях. Оказалось, что для этой цели можно использовать свойство переходных металлов образовывать хелатные комплексы. Хотя имеется широкий выбор переходных металлов, наиболее подходящими для данного случая свойствами обладают титан и цирконий, оксиды которых не токсичны.

2. Иммобилизация ферментов металлохелатным методом

2.1. Методы иммобилизации ферментов на носителях, активированных переходными металлами

2.1.1. Первоначальный вариант металлохелатного метода

Металлохелатный метод иммобилизации ферментов впервые разработал Новеис [3] в Университете г. Бирмингем (Великобритания) в опытах по иммобилизации ферментов на целлюлозе с использованием диазотирования. Хлорид титана (III) использовали на стадии восстановления нитроарильных производных целлюлозы [2-гидрокси-3- (*n*-нитрофенокси) пропилового эфира целлюлозы] для получения соответствующего аминоксильного производного, к которому затем присоединяли фермент диазотированием. Использование хлорида титана (III) приводило к получению препарата иммобилизованного фермента с большей активностью, чем в отсутствие этого реагента. На основании этих данных было предложено активировать носитель (целлюлозу) только солью переходного металла. Полученные результаты явно зависели от концентрации этой соли. Метод весьма прост и состоит всего из двух стадий, как показано в табл. 2-1.

2.1.2. Химия иммобилизации фермента

Каким образом соединения переходных металлов образуют хелатные комплексы с биополимерами, можно рассмотреть на примере простой системы: хлорид титана (IV) и целлюлоза. В растворе хлорида титана определенная часть ионов титана образует

Таблица 2-1. Активация носителя и связывание фермента

1. Взвесить в чашке 10 г микрокристаллической целлюлозы.
2. Добавить 50 мл 15%-ного (вес/объем) хлорида титана (IV) к 15%-ной (вес/объем) HCl и хорошо перемешать.
3. Поместить смесь в вакуумный эксикатор с гидроксидом натрия и откачать воздух.
4. Выдержать смесь в сушильном шкафу при 45 °C до полного высыхания (примерно 24 ч).
5. Промыть сухой остаток три раза буферным раствором (рН буфера обычно выбирают соответствующим оптимальной активности фермента), пока носитель не станет практически белым.
6. К промытому носителю добавить раствор фермента, содержащий 1 г белка, и перемешивать при 4 °C в течение 18 ч.
7. Отцентрифугировать суспензию и промыть иммобилизованный фермент буфером, затем буфером, содержащим 1 M NaCl, еще раз этими же растворами, затем еще два раза буфером.
8. Ресуспендировать иммобилизованный фермент в буфере и хранить при 4 °C.

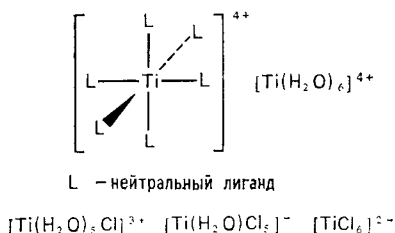


Рис. 2-1. Пример комплексного иона.

октаэдрические координационные комплексы с другими молекулами и ионами, которые в данном случае выступают в роли лигандов комплексного иона (пример комплексного иона приведен на рис. 2-1). Гидроксильные группы являются эффективными лигандами для ионов переходных металлов, и, следовательно, можно ожидать, что ионы переходных металлов будут образовывать комплексы с полисахаридами, гидроксильные группы которых будут замещать другие лиганды. Более того, хорошо известно, что гликоли — это очень эффективные лиганды ионов переходных металлов. Некоторые полисахариды, такие как целлюлоза, содержат две vicinalные гидроксильные группы, не участвующие в образовании гликозидных связей между углеводными остатками, и, следовательно, способные образовывать хелаты с ионами переходных металлов, замещая своими гидроксильными группами два лиганда иона титана. Таким образом, поскольку целлюлоза представляет собой полимер молекул D-глюкопиранозы, связанных β-1,4-связью, в образовании хелатов могут участвовать гидроксильные группы в положении 2 и 3. О возможности участия во взаимодействии целлюлозной цепи с титаном гидроксильной группы в положении 6 D-глюкопиранозного остатка можно лишь строить предположения. Стерически этой группе трудно приблизиться к другим гидроксильным группам целлюлозы и участвовать в образовании хелата. Таким образом, обработанную хлоридом титана целлюлозу можно рассматривать как полимерный хелат с аква-, хлораква- и хлор-комплексами титана, преобладающими в водном растворе хлорида титана (рис. 2-2).

Следует отметить, что по стерическим соображениям все лиганды иона титана заместить гидроксильными группами полисахаридной цепи невозможно. Более того, оставшиеся лиганды не будут замещаться гидроксильными группами соседней целлюлозной цепи из-за нерастворимости и недостаточной подвижности макромолекулы целлюлозы. Любая же другая молекула, содержащая группы, способные замещать лиганды, может образовать хелат с титаном, связанным с целлюлозой. Такая молекула должна находиться в водном растворе и pH раствора может быть бли-

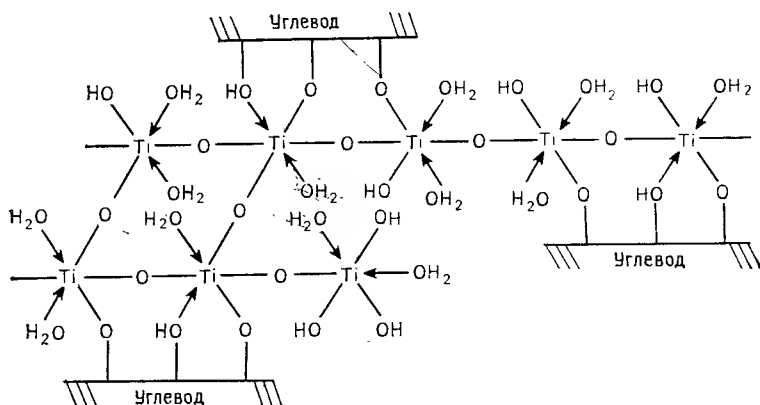


Рис. 2-2. Обработанная титаном целлюлоза, координационно связывающая вдоль своих цепей различные аква-, хлораква- и хлор-комплексы ионов титана, преобладающие в растворе.

зок к нейтральному. В случае белковых молекул, таких как ферменты, антитела и антигены, которые наиболее часто используют для иммобилизации, в качестве групп-лигандов могут выступать свободные карбоксильные группы кислых аминокислот, фенольные гидроксильные остатки тирозина, спиртовые гидроксильные группы остатков серина и треонина, свободные сульфгидрильные группы остатков цистеина и ε-аминогруппы остатков лизина.

Образование связи между полимером, обработанным титаном, и ферментом (с появлением ферментативно активного производного) будет успешным лишь при выполнении следующих условий:

а) в молекуле фермента должны присутствовать группы, способные выступать в роли лигандов;

б) контакт этих групп с атомами титана стерически возможен;

в) эти группы не должны находиться в области активного центра фермента;

г) молекулы фермента, уже связанные с носителем, не должны располагаться слишком близко друг к другу.

Возможность ионного связывания не следует принимать во внимание, поскольку связывание ферментов с титановыми комплексами полимеров может происходить и в ионной среде.

2.1.3. Свойства ферментов, иммобилизованных металлохелатным методом

В табл. 2-2 приведены типичные результаты, полученные при иммобилизации глюкоамилазы на ряде носителей с помощью солей различных переходных металлов. Применимость этого метода

Таблица 2-2. Использование солей переходных металлов для присоединения глюкоамилазы к инертным поверхностям

Носитель	Соль, используемая для активации	Концентрация соли (вес/объем), %	Активность ¹⁾ , ед. г	Количество связанного белка, мг г	Сохранение удельной активности, %
Микрокристаллическая целлюлоза	TiCl ₄	15,0	3300	95,5	52,0
		7,5	3020	93,5	49,0
		3,0	2800	92,0	46,0
		1,5	2600	85,0	46,5
		0,3	775	26,6	43,5
		0,15	665	13,8	72,5
	TiCl ₃	12,5	4570	147	46,5
		6,25	3380	106	44,0
		2,5	2600	88,5	45,5
		1,25	2350	69,5	51,0
	SnCl ₄	10,0	2100	58,8	56,0
		1,0	1080	20,4	83,0
	SnCl ₂	10,0	1325	44,9	45,0
	ZrCl ₄	10,0	2970	88,8	50,0
	VCl ₃	0,1	1192	43,5	41,0
		10,0	900	22,3	60,5
		10,0	1430	35,0	61,5
		10,0	1470	39,4	56,0
Порошок боросиликатного стекла	TiCl ₄	0,1	400	8,1	74,0
		15,0	2860	79,0	52,6
	TiCl ₃	12,5	2300	68,5	50,0
		10,0	1090	29,6	47,2
Волокна нейлона 66	TiCl ₄	15,0	2780	—	—
		7,5	1525	—	—

¹⁾ Одна единица активности глюкоамилазы соответствует высвобождению количества восстанавливающих сахаров, эквивалентного 1 мкмолью глюкозы, при 45°C за 1 мин в 1%-ном (вес/объем) растворе крахмала в 0,02 М ацетатном буфере, pH 4,5.

для других ферментов продемонстрирована в табл. 2-3. Как видно из этих таблиц, удельная активность получаемых препаратов обычно высокая (50—80%). В результате иммобилизации металлохелатным методом константа Михаэлиса фермента обычно не меняется (табл. 2-4).

Как видно из табл. 2-5, после иммобилизации pH-оптимум активности фермента в некоторых случаях не меняется, однако иногда наблюдается сдвиг на 0,5—1,0 единиц pH в кислую или щелочную сторону.

Анализ опубликованных работ, посвященных металлохелатному методу иммобилизации ферментов на различных носителях, показывает, что стабильность получаемых препаратов может варьировать в широких пределах. Более того, понятие стабильности зачастую вообще трактуют неадекватно, так как определяют только стабильность при хранении. Для оценки же потенциа-

Таблица 2-3. Сравнительные данные по сохранению удельной активности ферментов, связанных с носителями, активированными титаном (IV)

Фермент	Носитель	Сохранение удельной активности, %	Источник данных
α -Амилаза	Целлюлоза	54,0	[4]
Глюкоамилаза	»	46—72,5	[4, 5]
	Порошок боросиликатного стекла	56,2	[5]
	Пористое стекло (размер пор 100 Å)	20,0	[6]
	Сферон	60—82	[7]
Д-Глюкозооксидаза	Целлюлоза	61,5	[4]
Инвертаза	»	3,6	[4]
Нуклеаза Р1	Пористое стекло (размер пор 208 Å)	52,1	[8]
(дефосфорилирование 3'-АМР)	Пемза	66,2	[8]
	Силикагель (размер пор 85,5 Å)	46,1	[8]
	Силикагель (размер пор 190 Å)	63,2	[8]
(нуклеолитическая активность)	Пористое стекло (размер пор 208 Å)	36,0	[8]
	Пемза	52,1	[8]
	Силикагель (размер пор 87,5 Å)	13,5	[8]
	Силикагель (размер пор 190 Å)	42,1	[8]
Папаин	Стекловолокно		
(эстеразная активность)		76,6	[9]
(протеолитическая активность)		37,9	[9]
Трипсин	Сферон Р 100 000		
(эстеразная активность)		19,0	[7]
(протеолитическая активность)		0,46	[7]
Уреаза	Целлюлоза	70,0	[5]
	Найлон 66	81,0	[5]

ной возможности использования ферментного препарата в промышленных целях одним из наиболее важных тестов является его стабильность в процессе функционирования (операционная стабильность). Значения стабильности в процессе функционирования для ферментов, иммобилизованных металлохелатным методом, приведены в табл. 2-6.

Самая высокая стабильность была получена при относительно низких температурах для иммобилизованной инвертазы — фер-

Таблица 2-4. Сравнение констант Михаэлиса (K_M) ферментов, связанных с носителями, активированными титаном (IV)

Фермент	Носитель	K_M		Источник данных
		растворимый фермент	иммобилизованный фермент	
D-Глюкозоизомеразы	Целлюлоза	25,6% (вес/объем)	25,3% (вес/объем)	[10]
Инвертазы	Роговая обманка	50 мМ	50 мМ	[11]

мента, который очень стабилен при используемых для инкубации температурах. Вместе с тем металлохелатная иммобилизация такого стабильного фермента, как глюкоамилаза, приводила к резкому снижению его стабильности.

2.1.4. Проблемы металлохелатного метода

Хотя исходный вариант металлохелатного метода иммобилизации ферментов весьма прост в методическом отношении, некоторые авторы [12, 13] сообщили о невоспроизводимых результатах, наблюдаемых обычно для неорганических носителей. Взаимодействие солей переходных металлов [хлорида титана (IV)] с силанольными группами неорганических носителей не очень сильное [14, 15], и поэтому эффективность образования хелатов, которая зависит от гидрофильности носителя (т. е. от числа свободных силанольных групп на поверхности неорганического носителя), невелика.

На основании химических исследований Кеннеди [9] и Кабрал [15, 16] предположили, что в случае неорганических носителей иммобилизация ферментов осуществляется скорее за счет образования слоя гидроксида металла на поверхности носителя, чем за счет химического взаимодействия между переходным ме-

Таблица 2-5. Сравнение значений рН-оптимума активности ферментов, связанных с носителями, активированными титаном (IV)

Фермент	Носитель	рН-Оптимум		Источник данных
		растворимый фермент	иммобилизованный фермент	
Глюкоамилаза	Целлюлоза	4,5	4,5	[5]
D-глюкозоизомеразы	»	7,0	6,0	[10]
Инвертазы	Роговая обманка	5,0	4,0	[11]
Папайн	Стекловолокно	6,0	6,5	[9]
Нуклеаза Р 1	Пемза	5,3	5,3	[8]

Таблица 2-6. Операционная стабильность ферментов, иммобилизованных на носителях, активированных титаном (IV)

Фермент	Носитель	Рабочая температура, °С	Время полунинактивации	Источник данных
Глюкоамилаза	Целлюлоза	50	10 ч	[5]
	Пористое стекло	45	1 ч	[6]
Инвертаза	Роговая обманка	25	54 сут	[11]
	Пористое стекло	18	8 сут	[11]

таллом и носителем. Предполагают, что этот слой образуется при высушивании носителя в присутствии избытка раствора соли. Во время нагревания вода и хлористый водород испаряются и происходит образование гидроксида металла и (или) хлороксида с осаждением их на поверхности носителя. Однако стабильный слой образуется лишь в том случае, если смесь носителя и раствора переходного металла полностью высушена; при последующем промывании водой гидроксид металла может теряться [16].

Самым важным условием выполнения этой методики является полное высушивание смеси раствора соли переходного металла с носителем. Для получения высокоактивного препарата иммобилизованного фермента чрезвычайно важна также температура высушивания (активации). С увеличением температуры слой оксида металла легче формируется и становится более стабильным, но несмотря на это, степень хелатирования молекул фермента при этом уменьшается из-за снижения гидрофильности поверхности, т. е. из-за уменьшения числа активных участков, способных хелатировать молекулы фермента.

Другими важными параметрами являются отношения объема раствора соли переходного металла к весу носителя и времени активации к весу или объему носителя. Наилучшие результаты, главным образом для неорганических носителей, получают при активации высушиванием носителя в присутствии избытка раствора соли, так как в этом случае образуется максимальное количество гидроксида металла.

Однако в случае пористого носителя для получения максимальной ферментативной активности препарата следует подобрать оптимальное соотношение между количествами раствора соли и носителя, так как в присутствии избытка соли переходного металла поры носителя могут быть частично заблокированы, что приведет к снижению общей поверхности, доступной для иммобилизации фермента [16, 17].

Активацию носителя переходным металлом обычно проводят в течение ночи или 24 ч, причем время активации зависит от веса или объема носителя, поскольку в ходе активации толщина

Таблица 2-7. Влияние условий высушивания на операционную стабильность и состав препаратов глюкоамилазы, которая была иммобилизована на пористом стекле, модифицированном хлоридом титана (IV)

Время, ч	Активность, ед./г носителя		Количество связанного белка, мг/г носителя		Удельная активность, ед. г белка		Количество связанного титана, мг TiCl_4 /г носителя		Отношение белок/титан, мг/мг TiCl_4	
	A1)	B2)	A	B	A	B	A	B	A	B
0	71,5	239	3,45	18,5	20,8	12,9	23,2	98,0	0,153	0,189
1	—	105	—	11,5	—	9,13	—	95,6	—	0,120
24	40,0	62,7	3,41	11,1	11,7	5,64	22,2	95,0	0,154	0,117
48	33,6	45,7	3,37	10,8	9,97	4,24	20,5	94,7	0,164	0,114
72	28,5	38,5	3,14	11,1	9,09	3,47	21,7	94,5	0,145	0,117
96	—	26,4	—	10,7	—	2,46	—	94,1	—	0,114
120	25,6	17,6	3,11	9,56	8,25	1,84	20,6	93,2	0,151	0,103

¹⁾ А — высушивание при атмосферном давлении.

²⁾ В — высушивание в вакууме.

слоя реакционной смеси может изменяться. Однако если использованием подходящих сосудов толщину слоя удастся поддерживать постоянной в пределах от 3 до 5 мм, то и время активации будет постоянным (24 ч). Для получения высокого содержания титана на активированном носителе можно использовать вакуум [15] (табл. 2-7). Если активацию проводят в вакууме, то получают более высокое содержание титана (98,0 мг TiCl_4 на 1 г носителя), чем при атмосферном давлении (23,2 мг TiCl_4 на 1 г носителя). Это, по-видимому, связано с неполным высыханием смеси носителя с раствором TiCl_4 , который при последующем контакте с водой легко смывается в виде гидроксида Ti (IV). Даже если высушивание происходит в вакууме, количество титана (IV) в слое на поверхности носителя составляет только 6,5% исходного количества TiCl_4 , введенного в контакт с носителем (1500 мг TiCl_4 на 1 г носителя).

В течение первых часов функционирования наблюдается потеря титана препаратом, активированным в вакууме. Этой потерей частично обусловлено уменьшение ферментативной активности, хотя имеет место и потеря «свободного» фермента, не связанного с титаном, что проявляется в снижении отношения белок/титан в течение первых часов работы (табл. 2-7).

В случае носителя, активированного при атмосферном давлении, наблюдается одновременное, но незначительное уменьшение как белка, так и титана, т. е. отношение белок/титан остается примерно постоянным.

Хотя содержание белка более или менее постоянно, после первых 24 ч всегда наблюдается уменьшение удельной фермен-

тативной активности независимо от того, каким методом был активирован носитель. Эти результаты, так же как и данные, полученные в работах [6, 18], демонстрируют влияние поверхности носителя, активированного титаном (IV), на параметры, которые контролируют инактивацию глюкоамилазы, возможно, по типу ингибирования активирующего действия ионов других металлов.

2.2. Развитие металлохелатного метода

Исходный вариант металлохелатного метода применяют главным образом для полисахаридных носителей, а именно целлюлозы, для которой получают препараты иммобилизованных ферментов с наиболее высокой активностью. При попытке распространить этот метод на другие носители (неорганические и белковой природы) исследователи столкнулись с рядом трудностей. В связи с этим были разработаны методики, гарантирующие получение хороших результатов. Некоторые из этих методик описаны ниже.

2.2.1. Альтернативные методы активации неорганических носителей

Методы, представленные в табл. 2-8, 2-9 и 2-10, разработаны в университетах г. Лихай (США), Голуэй (Ирландия) и Бирмингем (Великобритания). В Университете г. Бирмингем были разработаны две методики (табл. 2-10), в которых осаждения гидроксида металла достигают нагреванием [12] и нейтрализацией [19, 20].

Таблица 2-8. Активация неорганических носителей солями переходных металлов (г. Лихай)

1. Взвесить 10 г неорганического носителя (пористого алюминия, нержавеющей стали, Ni-NiO) и поместить в колбу.
2. Поместить колбу в баню со льдом и добавить 62,5 мл охлажденной воды.
3. К смеси носителя и охлажденной воды медленно и с интенсивным перемешиванием добавить 6,3 мл хлорида титана (IV).
4. Извлечь колбу из бани со льдом, нагреть до 80°C и инкубировать при этой температуре в течение 1 ч.
5. Извлечь из колбы носитель, покрытый гидроксидом титана (IV), и тщательно промывать его водопроводной водой, пока промывные воды не станут чистыми.
6. Высушить промытый носитель в течение ночи при 110°C.
7. К активированному носителю добавить раствор фермента в деионизованной воде, содержащий 1 г белка, и инкубировать смесь при 0—5°C в течение 18 ч.
8. Удалить супернатант и промыть иммобилизованный фермент 4—6 раз деионизованной водой перед определением ферментативной активности.

Таблица 2-9. Активация неорганических носителей солями переходных металлов (г. Голуэй)

1. Взвесить 2 г неорганического носителя (роговой обманки, пористого стекла) и поместить его в сосуд емкостью 25 мл с завинчивающейся крышкой.
2. Добавить 10 мл 10%-ного (вес/объем) хлорида титана (IV) и прогреть смесь при 30 °C в течение 1 ч.
3. Удалить остаток раствора хлорида титана (IV).
4. Тщательно промыть активированный носитель дистиллированной водой.
5. Высушить промытый носитель в течение ночи при 100 °C.
6. К активированному носителю добавить раствор фермента, содержащий 0,5—0,4 г белка в соответствующем буфере (например в случае глюко-амплазы или инвертазы в 0,2 М ацетате натрия, pH 4,5), и инкубировать смесь при 4 °C в течение 16 ч.
7. Удалить раствор, содержащий несвязавшийся фермент.
8. Промыть иммобилизованный фермент тем же буфером, содержащим 1M NaCl, а затем буфером без NaCl.

В методе с использованием нагревания ключевым моментом является получение слоя оксида металла на непористых твердых шариках из свинцового стекла. Нагревание было использовано для фиксации слоя оксида металла на поверхности этих шариков. По данной методике сначала удаляли свинец, входящий в состав стекла, что приводило к появлению неровностей, улучшающих осаждение слоя оксида металла на поверхности стекла. Этого достигали травлением стекла 50%-ной серной кислотой и последующим кипячением с обратным холодильником в растворе хлорида титана (IV).

2.2.2. Активация носителей белковой природы

В большинстве случаев для иммобилизации ферментов путем образования хелатов переходных металлов используют хлорид титана (IV), чистый или в кислом растворе, а в качестве носителя — неорганические типа аэрогелей (стекло, диоксид кремния) или органические (поперечно-сшитые полисахариды гибридного типа аэрогель — ксерогель, например производные целлюлозы) матрицы. В таких случаях активацию раствором хлорида титана (IV) при низких pH можно легко провести без разрушения носителя.

Для более чувствительных носителей, например носителей белковой природы (желатины), условия активации должны быть как можно более мягкими, чтобы получить максимальное количество активного иммобилизованного фермента при минимальном повреждении носителя.

Главное препятствие, с которым приходится сталкиваться при активации хлоридом титана (IV) желатины, поперечно-сшитой

Таблица 2-10. Активация неорганических носителей солями переходных металлов (г. Бирмингем)

Методика с использованием прогрева

1. Взвесить 10 г свинцового стекла и поместить его в колбу.
2. Добавить 40 мл 4%-ного ЭДТА (динатриевая соль), pH 10, и оставить на 48 ч (эта обработка ведет к выщелачиванию поверхности стекла).
3. Тщательно промыть протравленное стекло дистиллированной водой.
4. Добавить 40 мл 50%-ной (по объему) H_2SO_4 и оставить при комнатной температуре на 5 сут.
5. Тщательно промыть стекло дистиллированной водой.
6. Добавить 40 мл 15%-ного (вес/объем) хлорида титана (IV) в 15%-ной (вес/объем) соляной кислоте и прокипятить с обратным холодильником в течение 3—5 ч.
7. Удалить раствор хлорида титана (IV) и тщательно промыть носитель дистиллированной водой.
8. К активированному носителю добавить раствор фермента в соответствующем буфере (т. е. в буфере, имеющем pH, оптимальный для ферментативной активности), содержащий 1 г белка, и инкубировать смесь при 4°C в течение 18 ч.
9. Промыть иммобилизованный фермент тем же буфером (30 мин с перемешиванием), буфером, содержащим 1 M NaCl (30 мин с перемешиванием), 6 M мочевиной (60 мин с перемешиванием) и еще раз буфером (30 мин с перемешиванием).

Примечание: по желанию экспериментатора в методику можно включить дополнительную стадию просушивания активированного носителя при 600°C в течение 8 ч перед присоединением фермента.

Методика с использованием нейтрализации

1. Взвесить 10 г магнетита [Fe_3O_4 ; Fe(II) и 2Fe(III)].
2. Добавить 5 мл хлорида титана (IV) и сразу же разбавить смесь 100 мл дистиллированной воды.
3. Нейтрализовать раствор до pH 5,8 1M гидроксидом аммония при непрерывном перемешивании.
4. Отделить избыток жидкости центрифугированием.
5. Промыть активированный носитель соответствующим буфером и добавить раствор фермента (в качестве раствора α -амилазы использовать неразбавленный фильтрат культуры *Bacillus* sp.).
6. Встряхивать при 4°C в течение 1 ч, удалить раствор, содержащий не связавшийся фермент, и пятькратно промыть иммобилизованный фермент буфером.

глутаровым альдегидом, — это очень низкие значения pH обычно используемого коммерческого раствора хлорида титана (IV) в соляной кислоте. Из-за низкого pH может происходить денатурация белковой основы носителя. Однако разработаны мягкие методы активации, при использовании которых титан (IV) остается в растворимой и реакционноспособной форме при высоких значениях pH и, следовательно, белковые структуры разрушаются значительно меньше [21, 22]. Эти методики приведены в табл. 2-11. Влияние различных методов иммобилизации на активность глю-

Таблица 2-11. Активация носителей белковой природы

Активация комплексом хлорид титана (IV) — акриламид

1. При постоянном перемешивании к 400 мл раствора хлорида титана (0,1 моль) в безводном хлористом метиле добавить 400 мл раствора акриламида (0,1 моль) в этом же растворителе.
2. Продолжать перемешивание в течение 10 мин. При этом из вязкого раствора образуется затвердевающий комплекс желтого цвета.
3. Отделить комплекс фильтрованием, измельчить, промыть хлористым метилом и высушить при комнатной температуре.
4. К 2 мл частиц желатины, обработанных глутаровым альдегидом, добавить 20 мл водного раствора комплекса хлорид титана (IV) — акриламид (100 мг/мл), pH 3,0.
5. Перемешать смесь в течение 30 мин при 18 °C.
6. Удалить супернатант и промыть активированные частицы желатины 0,1 М ацетатным буфером, pH 4,5.
7. Сразу же после активации использовать носитель для связывания фермента.

Активация комплексом хлорид титана (IV) — мочевины

Этот комплекс готовят аналогично описанному выше.

1. К 200 мл раствора (0,1 моль) хлорида титана (IV) в безводном хлористом метиле при интенсивном перемешивании добавить 400 мл суспензии перекристаллизованной мочевины (0,1 моль) в этом же растворителе.
2. После инкубации в течение 80 ч отделить фильтрованием твердый осадок желтого цвета. Измельчить его, промыть безводным хлористым метилом и высушить при комнатной температуре.
3. К 2 мл частиц желатины, обработанных глутаровым альдегидом, добавить 5,0 мл водного раствора комплекса хлорид титана (IV) — мочевины (40 мг/мл), pH 3,0.
4. Перемешать смесь в течение 60 мин при 18 °C.
5. Удалить супернатант и промыть активированные частицы 0,1 М ацетатным буфером, pH 4,5.
6. Сразу же после активации использовать носитель для связывания фермента.

Активация комплексом хлорид титана (IV) — лимонная кислота

1. К 40 мл 0,05 М раствора лимонной кислоты добавить 0,1 мл 15%-ного (вес/объем) хлорида титана (IV) в 15%-ной (вес/объем) соляной кислоте. Довести pH до 4,5 5,0 М аммиаком.
2. К 2 мл частиц желатины, обработанных глутаровым альдегидом, добавить 50 мл раствора хлорида титана (IV) и лимонной кислоты, приготовленного как описано выше.
3. Перемешать смесь в течение 60 мин при 18 °C.
4. Удалить супернатант и промыть активированные частицы 0,1 М ацетатным буфером, pH 4,5.
5. Сразу же после активации использовать носитель для связывания фермента.

Активация комплексом хлорид титана (IV) — лактоза

1. К 18,0 мл 0,5 М лактозы добавить 2,0 мл 15%-ного (вес/объем) хлорида титана (IV) в 15%-ной (вес/объем) соляной кислоте. Довести pH до 3,0 5,0 М аммиаком.
2. К 2 мл частиц желатины, обработанных глутаровым альдегидом, добавить 5,0 мл раствора хлорида титана (IV) и лактозы, приготовленного, как описано выше.

Продолжение

3. Перемешать смесь в течение 60 мин при 18 °С.
4. Удалить супернатант и промыть активированные частицы 0,1 М ацетатным буфером, pH 4,5.
5. Сразу же после активации использовать носитель для связывания фермента.

Активация желатины (обработанной глутаровым альдегидом) свободным хлоридом титана (IV)

1. К 5 г промытых водой влажных частиц желатины, обработанных глутаровым альдегидом, или к 2 г лиофилизированных частиц желатины добавить 1 мл хлорида титана (IV).
2. Инкубировать смесь в течение 0,5—4,0 мин с периодическим перемешиванием.
3. Удалить избыток хлорида титана (IV) и промывать активированные частицы 0,1 М ацетатным буфером, pH 4,5, пока значения pH буфера и промывных вод не сравняются.
4. Сразу же после активации использовать носитель для связывания фермента.

коамилазы, иммобилизованной на поверхности частиц желатины, поперечно-сшитой глутаровым альдегидом, показано в табл. 2-12.

Хлорид титана (IV) можно использовать и не в виде комплекса, т. е. в более реакционноспособной форме. При использовании его в чистом виде или в виде раствора в соляной кислоте для активации частиц желатины, поперечно-сшитой глутаровым альдегидом, наиболее высокие значения активности иммобилизованной глюкоамилазы получают при использовании лиофилизированных частиц желатины.

2.2.3. Активация ионообменных носителей

Подходящими носителями в виде частиц сферической формы (что создает дополнительные гидродинамические преимущества при использовании в ферментных реакторах) являются ионооб-

Таблица 2-12. Влияние метода иммобилизации с использованием комплекса хлорида титана (IV) на активность глюкоамилазы, связанной с желатиной (время активации 1 ч)

Комплекс, использованный для активации	Активность ¹⁾ , ед./г
TiCl ₄ — акриламид	1,03
TiCl ₄ — мочевины	0,36
TiCl ₄ — лимонная кислота	0,41
TiCl ₄ — лактоза	0,48

¹⁾ Одна единица активности глюкоамилазы соответствует высвобождению 1 мкмоль D-глюкозы за 1 мин в 1%-ном (вес/объем) растворимом крахмале при 55 °С и pH 4,5.

Таблица 2-13. Активация носителей с ионообменными свойствами

1. Суспендировать 1 мл полистиролсульфонатного катионообменника (H^+ -форма) в 2 мл 20%-ного (вес/объем) водного раствора хлорида титана (IV). Встряхивать смесь в течение 60 мин при 20 °C.
2. Удалить супернатант и промыть носитель 0,1 М ацетатным буфером, pH 5,0.
3. Суспендировать смолу, уравновешенную титаном (IV), в растворе нуклеазы P1 (2 мг/мл) в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,0, содержащем 0,1 М $ZnCl_2$. Встряхивать суспензию в течение 60 мин при 20 °C.
4. Удалить раствор, содержащий несвязавшийся белок.
5. Промыть иммобилизованный фермент на фильтре из пористого стекла 5 раз 1 М раствором NaCl в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,0, и 3 раза буфером без NaCl.

менники на основе поперечно-сшитого полистирола. Катионообменник на основе полистиролсульфокислоты можно уравновесить ионами переходных металлов (Ti^{4+} , Zr^{4+} , V^{5+} и др.) и использовать для иммобилизации ферментов хелатным методом. Типичная методика описана в табл. 2-13.

2.2.4. Активация нейлоновых трубок

Еще один вариант металлохелатного метода, используемый для активации нейлоновых трубок солями переходных металлов, приведен в табл. 2-14. Согласно этому методу, поверхность нейлоновых трубок подвергают гидролизу. В результате на поверхности образуются карбоксильные и аммониевые группы, которые могут играть роль лигандов для ионов переходных металлов.

Таблица 2-14. Активация нейлоновых трубок

1. Прокачать 50 мл 10%-ного (вес/объем) хлорида титана (IV) в пентане через высушенную на воздухе (45 °C) нейлоновую трубку (2,6 мм×1,9 мм) с частично гидролизованной поверхностью (скорость перфузии 1,7 мл/мин, время активации 30 мин).
2. Просушить трубку при 45 °C в течение 2 ч.
3. Промыть активированную трубку 250 мл 0,05 М трис-HCl, pH 8,0.
4. Растворить 20 мг фермента (глюкозодегидрогеназы, 260 ед/мг белка) в 5 мл этого же буфера, содержащего 3,3 мг NAD.
5. Прокачать раствор фермента через трубку (рециркуляция) при 4 °C в течение 24 ч со скоростью перфузии 1 мл/мин.
6. Промыть трубку с присоединенным ферментом последовательно 100 мл буфера, использовавшегося для пришивки фермента, 100 мл 1 М NaCl в 0,12 М фосфатном буфере, pH 7,4, и 100 мл 0,5 М цитрата натрия, pH 7,4.
7. До использования трубку с иммобилизованным ферментом хранить при низкой температуре в незаполненном состоянии.

2.3. Поперечное сшивание ферментов, иммобилизованных металлохелатным методом

Поскольку ферменты, иммобилизованные на неорганических носителях, покрытых слоем гидроксида титана (IV), имеют низкую операционную стабильность, для уменьшения потерь белка (вследствие его утечки в раствор) в процедуру иммобилизации можно ввести дополнительную стадию поперечного сшивания иммобилизованного белка.

2.3.1. Поперечное сшивание глутаровым альдегидом

В качестве поперечно-сшивающего агента чаще всего используют глутаровый альдегид. Сшивка ферментов глутаровым альдегидом представляет собой реакцию между этим бифункциональным реагентом и свободными аминогруппами фермента (рис. 2-3). Реакция образования связи между аминогруппами и глутаровым альдегидом практически необратима; она устойчива при экстре-

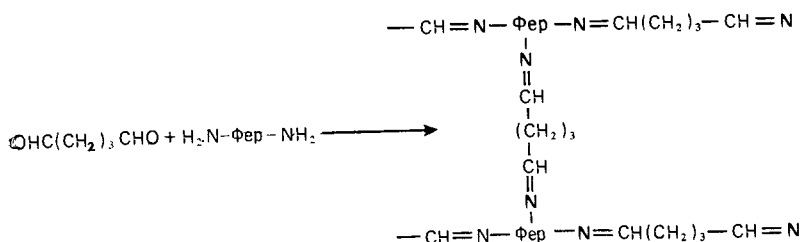


Рис. 2-3. Поперечные сшивки между молекулами фермента, полученные с помощью глутарового альдегида в реакции между этим реагентом и свободными аминогруппами аминокислотных остатков фермента.

Таблица 2-15. Поперечное сшивание глюкоамилазы, иммобилизованной на стекле с порами контролируемого размера

1. Иммобилизовать фермент на стекле с порами контролируемого размера, модифицированном гидроксидом титана (IV), как описано в разд. 2.2.1.
2. Препарат иммобилизованного фермента не промывать.
3. Добавить 20 мл 5%-ного (вес/объем) глутарового альдегида в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,0, и инкубировать смесь 2 ч при 4°C.
4. Удалить раствор поперечно-сшивающего реагента.
5. Промыть препарат поперечно-сшитого иммобилизованного фермента 20 мл каждого из следующих растворов:
 - а) 0,02 М ацетатного буфера, pH 4,5, в течение 10 мин;
 - б) 1 М NaCl в этом же буфере в течение 10 мин;
 - в) 6 М мочевины, в течение 30 мин;
 - г) ацетатного буфера в течение 10 мин.
6. До определения активности иммобилизованный фермент хранить в холодильнике.

мальных значениях pH и температуры. Методика сшивания глюкоамилазы, которая иммобилизована на стекле с порами контролируемого размера, модифицированном гидроксидом титана (IV), приведена в табл. 2-15. При корректной постановке опытов следует изучить влияние концентрации глутарового альдегида, времени сшивки и pH на активность иммобилизованного фермента, а также установить, не происходит ли утечки поперечно-сшитого фермента с носителя.

Благодаря обработке глутаровым альдегидом иммобилизованные ферменты становятся более стабильными, но при этом снижается их активность.

2.4. Иммобилизация ферментов на носителях, активированных переходными металлами

Хотя металлохелатным методом получают препараты иммобилизованных ферментов с высокой исходной активностью, их операционная стабильность, как правило, низкая, особенно при

использовании высокомолекулярных субстратов [6, 12]. При введении стадии поперечного сшивания стабильность иммобилизованных ферментов увеличивается, но исходная активность при этом значительно снижается. Чтобы обеспечить получение стабильных и активных препаратов иммобилизованных ферментов, были разработаны варианты металлохелатного метода. Обычно они включают образование ковалентной связи между ферментом и производным гидроксида титана (IV) на поверхности носителя. Две методики, основанные на азосочетании и образовании шиффовых оснований, приведены в табл. 2-16. Простой метод иммобилизации ферментов ковалентным

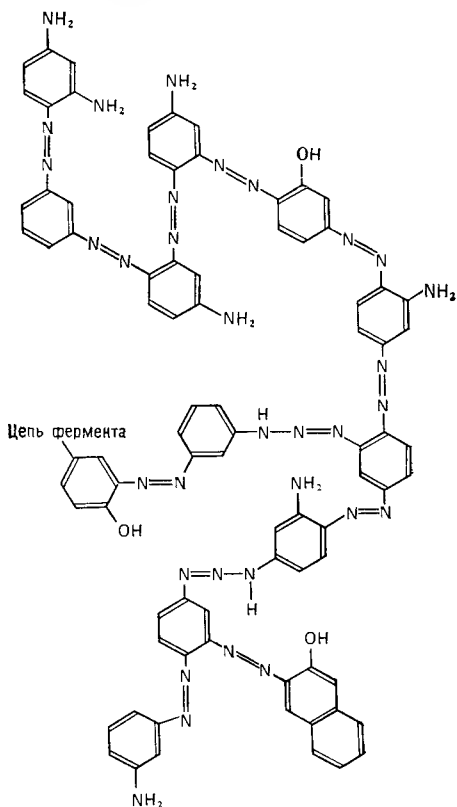


Рис. 2-4. Иммобилизация ферментов ковалентным присоединением с помощью азосочетания, достигаемого благодаря покрытию носителя 1,3-диаминобензолом.

Таблица 2-16. Иммобилизация ферментов на дополнительно модифицированных носителях, активированных переходными металлами

Присоединение фермента азосочетанием

1. Взвесить 2 г пористого оксида титана (IV) и добавить к нему 40 мл раствора 1,3-диаминобензола (25 мг/мл) в 1 М соляной кислоте. Поддерживать температуру 0 °С.
2. Медленно при постоянном встряхивании добавить 30 мл 6%-ного водного раствора пикриата натрия, охлажденного до 0 °С.
3. Встряхивать смесь при 0 °С в течение 30 мин и затем удалить жидкость декантацией.
4. Быстро промыть носитель 3×100 мл 0,2 М натрий-ацетатного буфера, pH 5,0, охлажденного до 0 °С.
5. Добавить 20 мл раствора фермента в этом же буфере. Инкубировать при 4 °С в течение 2 ч.
6. Удалить раствор, содержащий несвязавшийся фермент, и встряхивать носитель в насыщенном растворе 2-нафтола (в насыщенном ацетате натрия; 200 мл) при 4 °С в течение 4—5 ч.
7. Удалить раствор и промыть носитель 5×100 мл 0,2 М натрий-ацетатного буфера, pH 5,0, охлажденного до 4 °С.
8. Иммобилизованный фермент хранить при 4 °С в этом же буфере.

Примечание: Перед стадией присоединения фермента происходит полимеризация диазотированного 1,3-диаминобензола, но некоторые аминогруппы остаются неизменными. Последующую реакцию с 2-нафтолом используют для блокирования непрореагировавших диазогрупп.

Присоединение фермента к аминоалкильному производному носителя, активированного титаном (IV)

1. К 1 г стекла с порами контролируемого размера добавить 2,5 мл 15%-ного (вес/объем) хлорида титана (IV) в 15%-ной (вес/объем) соляной кислоте и просушить смесь в сушильном шкафу при 45 °С в течение 30 ч (образуется хлороксипроизводное носителя).
2. К хлороксипроизводному носителю добавить 5 мл 1%-ного (вес/объем) 1,6-диаминогексана в четыреххлористом углероде и прогреть смесь при 45 °С в течение 30 мин (образуется алкиламинопроизводное носителя).
3. Удалить избыток раствора амина декантацией и промыть носитель 3×10 мл метанола и 3×10 мл дистиллированной воды.
4. Добавить 5 мл 5%-ного (вес/объем) глutarового альдегида в 0,05 М пиррофосфатном буфере, pH 8,6. Инкубировать в течение 1 ч при 25 °С (образуется альдегидное производное носителя).
5. Удалить избыток раствора альдегида декантацией и промыть носитель 3×10 мл дистиллированной воды и 10 мл 0,02 М натрий-ацетатного буфера, pH 4,5.
6. К альдегидному производному носителя добавить 20 мл раствора фермента в 0,02 М натрий-ацетатном буфере, pH 4,5. Инкубировать в течение 2 ч при 4 °С.
7. Промыть иммобилизованный фермент, перемешивая его в 20 мл каждого из следующих растворов: 0,02 М натрий-ацетатного буфера, pH 4,5 (10 мин); 1 М NaCl в этом же буфере (10 мин); 6 М мочевины (30 мин) и 0,02 М натрий-ацетатного буфера, pH 4,5 (10 мин).

Примечание. Для получения активного и стабильного препарата фермента одним из наиболее важных факторов является природа растворителя для диамина. При использовании воды или гидрофильного растворителя молекулы растворителя будут конкурировать с молекулами диамина за хлорид-ионы на поверхности хлороксипроизводного носителя, активированного титаном (IV), что приведет к снижению количества аминогрупп на поверхности носителя.

связыванием с использованием реакции азосочетания включает в себя покрытие поверхности носителя диазотированным 1,3-диаминобензолом (рис. 2-4).

Метод с образованием шифровых оснований базируется на активации носителя солями переходных металлов, обычно хлоридом титана (IV), последующем аминировании раствором подходящего диамина в гидрофобном растворителе для получения алкиламинопроизводного и, наконец, реакции с бифункциональным реагентом, который образует мостик между алкиламинопроизводным носителя и ферментом.

2.5. Иммобилизация ферментов и биомолекул на гидроксидах переходных металлов

Новый метод иммобилизации ферментов был разработан на основе химии гидроксидов переходных металлов, главным образом титана (IV) и циркония (IV). Единственный необходимый для этого метода (помимо фермента) реагент доступен в виде коммерческого препарата и достаточно стабилен. С экономической же точки зрения одностадийный процесс иммобилизации более предпочтителен. В этом методе в качестве носителя используют собственно гидроксид металла, который можно получить осаждением при гидролизе соответствующего хлорида. Молекулы фермента иммобилизуются путем образования хелатов.

В некоторых методах используется совместное осаждение гидроксидов металлов с ферментами. Такое осаждение может при-

Таблица 2-17. Иммобилизация ферментов на гидроксидах переходных металлов

1. К 1 мл (1,73 г) хлорида титана (IV) добавить 20 мл дистилл. воды ¹⁾.
2. Сразу же нейтрализовать смесь 1 М аммиаком до pH 7,0.
3. Отцентрифугировать образовавшуюся суспензию и удалить супернатант.
4. Тщательно промыть осадок 5×25 мл дистиллированной воды.
5. Отцентрифугировать суспензию и удалить супернатант.
6. Суспендировать гидроксид титана (IV) в растворе фермента с pH 7,0. Инкубировать при 4°C в течение 1 ч.
7. Отцентрифугировать смесь и удалить супернатант.
8. Промыть осадок [гидроксид титана (IV) с присоединенным ферментом] 10×25 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,0, содержащего 10^{-2} М гидрохлорида L-цистеина и $4 \cdot 10^{-4}$ М ЭДТА.
9. Хранить препарат иммобилизованного фермента в 25 мл этого буфера при 4°C.

¹⁾ Вместо чистого хлорида титана (IV) можно использовать его раствор в кислоте, например имеющийся в продаже 15%-ный (вес/объем) раствор в 15%-ной (вес/объем) соляной кислоте или 50%-ный (вес/объем) раствор в 6 н. соляной кислоте. Могут быть использованы также хлориды других металлов: кобальта (II), меди (II), железа (II), марганца (II), олова (II), цинка (II), циркония (III), железа (III), ванадия (II), олова (IV) и циркония (IV). В стандартном методе получения гидроксидов металлов растворы готовят, добавляя требуемое количество хлорида металла в 1 н. или в случае олова (IV) в 5 н. соляную кислоту, так чтобы получить 0,65 М раствор. Можно также использовать хлорид титана (III) в виде коммерчески доступного 12,5%-ного (вес/объем) раствора в 6 н. соляной кислоте.

вести к получению более активного продукта, чем при последующем добавлении фермента, так как поверхность растущей частицы выпадающего в осадок гидроксида очень велика. Однако при этом необходимо учесть риск инактивации фермента вследствие инкубации его при экстремальных (низких) значениях pH.

Чтобы получить возможно более высокую ферментативную активность, нужно оптимизировать процесс иммобилизации относительно некоторых наиболее важных условий, таких как продолжительность иммобилизации, pH, соотношение количеств фермента и носителя. Методика с использованием в качестве соли переходного металла хлорида титана (IV) приведена в табл. 2-17.

3. Иммобилизация микробных клеток металлохелатным методом

Иммобилизация ферментов путем присоединения к водонерастворимым носителям сразу же привлекла к себе внимание, и возможности этого подхода стали интенсивно изучаться [2]. Логическим развитием его, особенно в отношении многостадийных химических реакций, является иммобилизация микроорганизмов, которые зачастую представляют собой источник многих ферментов. Преимущества такого подхода очевидны: при этом исключается трудоемкая и длительная процедура экстракции и очистки ферментов. Вместе с тем в клетке присутствуют все кофакторы, так что коферменты и ферменты во многих случаях уже организованы в необходимые метаболические ансамбли, и поэтому отпадают проблемы, связанные с нестабильностью ферментов. Кроме того, использование иммобилизованных клеток устраняет проблему отделения продуктов от фермента в промышленных процессах.

При исследовании ряда гелеобразных гидратированных оксидов металлов (их часто называют гидроксидами, хотя их точная структура не определена) было установлено, что гидроксиды титана (IV), циркония (IV), железа (III), ванадия (III) и олова (II) способны образовывать с ферментами нерастворимые комплексы, обладающие ферментативной активностью. С практической точки зрения наиболее подходящими оказались гидроксиды титана (IV) и циркония (IV). При этом удавалось достичь относительно высокой степени сохранения удельной активности ферментов [24—27]. Такие гидроксиды металлов оказались подходящими носителями для иммобилизации аминокислот, пептидов [24], антибиотиков с антимикробной активностью [28], полисахаридов [29] и др.

В диапазоне физиологических значений pH гидроксиды титана (IV) и циркония (IV) водонерастворимы и, следовательно, обеспечивают хорошее сохранение ферментативной активности при использовании их в качестве носителя и практически не влияют на функционирование биологически активных молекул.

Поскольку при иммобилизации не происходит значительных изменений ферментативной активности, которая чрезвычайно чувствительна к конформационным изменениям молекулы фермента, можно ожидать, что клеточные стенки также не повреждаются при этом и, следовательно, скорее всего сами клетки остаются жизнеспособными.

3.1. Иммобилизация клеток микроорганизмов на гидроксидах металлов

Процесс иммобилизации на гидроксидах металлов представляет собой замещение гидроксильных групп на поверхности гидроксида подходящими лигандами, входящими в состав фермента или клетки. В результате образуются связи, аналогичные ковалентным. В случае ферментов такими лигандами могут быть гидроксилы боковых цепей L-серина или L-треонина, карбоксильные группы L-глутаминовой кислоты или L-аспарагиновой кислоты, ε-аминогруппы остатков лизина, причем лиганды, содержащие кислород, предпочтительнее лигандов, содержащих азот. В случае клеток структурная сложность клеточных оболочек обеспечивает достаточное разнообразие подходящих лигандов, входящих в состав белковых и углеводных компонентов клеточной стенки. Методика иммобилизации клеток микроорганизмов на гидроксидах металлов путем образования хелатов описана в табл. 2-18.

Жизнеспособность иммобилизованных клеток *Saccharomyces cerevisiae* и *Escherichia coli* можно проверить с помощью измерения количества поглощенного ими кислорода [при 25 °C в аэрируемом 0,2 М ацетате натрия, pH 5,0, или 0,9%-ном (вес/объем) NaCl с использованием кислородного электрода]. Скорость поглощения кислорода иммобилизованными клетками составляла примерно 30% скорости, измеренной для того же количества нативных кле-

Таблица 2-18. Иммобилизация клеток микроорганизмов на гидроксидах металлов

1. К 15%-ному (вес/объем) хлориду титана (IV) в 15%-ной (вес/объем) соляной кислоте [или к 0,65 М хлориду циркония (IV) в 1 н. соляной кислоте] медленно добавить 2,0 М аммиак до нейтральной реакции смеси (pH 7,0).
2. Промыть осадок 3×5 мл 0,9%-ного (вес/объем) NaCl для удаления ионов аммония.
3. К полученному гидроксиду металла добавить 10 мл суспензии клеток *Escherichia coli* в 0,9%-ном (вес/объем) NaCl ($A_{600}^{1\text{см}} = 0,216$). Осторожно перемешать в течение 5 мин при комнатной температуре.
4. Оставить суспензию при комнатной температуре для образования осадка и прозрачного супернатанта ($A_{600}^{1\text{см}} = 0,222$). (Примечание: с помощью микроскопа установлено, что супернатант практически не содержит клеток микроорганизмов.)
5. Уплотнить препарат иммобилизованных клеток низкоскоростным центрифугированием и удалить супернатант.

ток, т. е. после иммобилизации клетки сохраняют дыхательную активность. Уменьшение скорости потребления кислорода, вероятно, связано с ограничением гидроксидом металла доступа аэрированного буферного раствора к клеткам и уменьшением поверхности клеток, доступной для переноса кислорода.

Доказательство того, что клетки прочно связаны с поверхностью гидроксида металла, а не просто включены в гелеобразный носитель, можно получить с помощью другого микроорганизма, *Serratia marcescens*. При инкубации в питательной среде при 25 °C эта бактерия окрашивается в характерный красный цвет. Данный эффект позволяет легко отличить иммобилизованные клетки от других микроорганизмов, что дает возможность работать в нестерильных условиях.

При добавлении культуры *S. marcescens* к гидроксидам циркония (IV) и титана (IV) красное окрашивание (т. е. клетки) наблюдается на нерастворимом носителе, тогда как в супернатанте (в растворе соли, которым затем промывали носитель) клеток почти нет. Это свидетельствует о прочности взаимодействия клеток с гидроксидом металла. В качестве примера применения иммобилизованных металлохелатным методом живых клеток можно привести сообщение Кеннеди и др. [30] об использовании таких клеток для уксуснокислого брожения (производство уксуса).

3.2. Иммобилизация клеток на носителях, активированных переходными металлами

Носители, активированные переходными металлами, также могут быть использованы для иммобилизации клеток, как описано в табл. 2-19.

Иммобилизация дрожжевых клеток на пемзе, модифицированной гидроксидом титана, позволяет получать стабильные препараты с высокой активностью.

Таблица 2-19. Иммобилизация клеток на носителях, активированных переходными металлами

1. К 1 г пемзы добавить 3 мл 15%-ного (вес/объем) хлорида титана (IV) в 15%-ной (вес/объем) соляной кислоте.
2. Просушить смесь в сушильном шкафу в течение 48 ч при 45 °C (при этом образуется хлороксипроизводное носителя).
3. Промыть носитель, активированный титаном (IV), 3×10 мл дистиллированной воды (при этом образуется гидроксидное производное носителя).
4. Добавить 10 мл 2%-ной (сырой вес/объем) суспензии клеток пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) в 0,02 М натрий-ацетатном буфере, pH 4,5. Инкубировать в течение 2 ч при 4 °C.
5. Удалить супернатант, содержащий несвязавшиеся клетки.
6. Промыть препарат иммобилизованных клеток 3×10 мл дистиллированной воды и 10 мл ацетатного буфера.

Литература

1. *Kennedy J. F., Cabral J. M. S.* In: *Solid-Phase Biochemistry: Analytical and Synthetic Aspects*, (Scouten W. H., ed.), p. 253, John Wiley, New York, 1983.
2. *Kennedy J. F., Cabral J. M. S.* In: *Applied Biochemistry and Bioengineering* (Chibata I. and Wingard L. B., eds.), vol. 4, p. 490, Academic Press, New York, 1983.
3. *Novais J. M.* Ph. D. Thesis, University of Birmingham, UK, 1974.
4. *Barker S. A., Emery A. N., Novais J. M.* *Process Biochem.*, **6**, 11 (1971).
5. *Emery A. N., Hough J. S., Novais J. M., Lyons T. P.* *Chem. Eng.*, **259**, 71 (1972).
6. *Cabral J. M. S., Cardoso J. P., Novais J. M.* *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 41 (1981).
7. *Gray C. J., Lee C. M., Barker S. A.* *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 143 (1982).
8. *Rokugawa K., Fujishima T., Kurinaka A., Yoshino H.* *J. Ferment. Technol.*, **58**, 509 (1980).
9. *Kennedy J. F., Pike V. W.* *Enzyme Microb. Technol.*, **1**, 31 (1979).
10. *Kent C. A., Emery A. N.* *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **24**, 663, (1974).
11. *Thornton D., Flynn A., Johnson D. B., Ryan P. D.* *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1679, (1975).
12. *Cardoso J. P., Chaplin M. F., Emery A. N., Kennedy J. F., Revel-Chion L. P.* *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **28**, 775 (1978).
13. *Kennedy J. F., Watts P. M.* *Carbohydr. Res.*, **32**, 155 (1974).
14. *Cabral J. M. S., Kennedy J. F., Novais J. M.* *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 337 (1982).
15. *Cabral J. M. S., Kennedy J. F., Novais J. M., Cardoso J. P.* *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 228 (1984).
16. *Cabral J. M. S.*, Ph. D. Thesis, Technical University of Lisbon. Portugal (1982).
17. *Cabral J. M. S., Novais J. M., Cardosa J. P.* *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2083 (1981).
18. *Flynn A., Johnson D. B.* *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1445 (1978).
19. *Kennedy J. F., Barker S. A., White C. A.* *Starke*, **29**, 240 (1977).
20. *Kennedy J. F., White C. A.* *Starke*, **31**, 375 (1979).
21. *Kennedy J. F., Kalogerakis B.* *Biochimie*, **62**, 549 (1980).
22. *Kennedy J. F., Kalogerakis B., Cabral J. M. S.* *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 68 (1984).
23. *Kennedy J. F., Kay I. M.* *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.*, 329 (1976).
24. *Kennedy J. F., Barker S. A., Humphreys J. D.* *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.*, 962 (1976).
25. *Kennedy J. F., Pike V. M.* *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.*, 1058 (1978).
26. *Kennedy J. F., Humphreys J. D., Barker S. A.* *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 129 (1981).
27. *Kennedy J. F., Kay I. M.* *Carbohydr. Res.*, **44**, 291 (1975).
28. *Kennedy J. F., Humphreys J. D.* *Antimicrob. Agents Chemother.*, **9**, 766 (1976).
29. *Kennedy J. F., Barker S. A., White C. A.* *Carbohydr. Res.*, **54**, 1 (1977).
30. *Kennedy J. F., Humphreys J. D., Barker S. A., Greenshields R. N.* *Enzymes Microd. Technol.*, **2**, 209 (1980).

ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК И ФЕРМЕНТОВ ВКЛЮЧЕНИЕМ ИХ В ГЕЛЬ

Марек П. Дж. Кирстен и Майкл П. Кафлэн

1. Введение

Уже много тысяч лет человек умеет выпекать хлеб, делать вино и дубить кожу. Конечно, он научился этим необходимым для повседневной жизни операциям, не вникая в суть происходящих при этом биологических процессов. Понимать клеточный метаболизм и выяснять каталитические свойства ферментов мы начали лишь относительно недавно. Приобретенные в этой области знания позволяют человеку более полно использовать возможности клеток и ферментов для бытовых, промышленных и медицинских целей.

1.1. Почему иммобилизация?

Очевидно, при выборе катализатора реакции, представляющей промышленный интерес, важным моментом является специфичность фермента. Однако часто стоимость получения необходимого фермента в производственных масштабах слишком высока. В этих случаях может оказаться эффективным применение иммобилизованных ферментов, так как они более стабильны и могут использоваться многократно. Действительно, уже известно несколько ярких примеров успешного использования иммобилизованных ферментов [2]. Тем не менее справедливости ради следует признать, что применение иммобилизованных препаратов индивидуальных ферментов оказалось менее успешным, чем можно было бы надеяться. В качестве недостатков в данном случае называют нестабильность фермента в процессе работы (операционную нестабильность) и способность катализировать только одну-единственную реакцию. Кроме того, для практических целей могут быть использованы только те ферменты, для которых не требуется регенерации кофакторов. Эти недостатки способствовали возрождению интереса к использованию потенциальных возможностей клеточного метаболизма. Мессинг [10] справедливо отмечает, что многие примеры иммобилизованных клеток можно найти в природе и что впервые их применили в технологическом процессе еще 150 лет назад (имеется в виду быстрый способ получе-

ния укуса). Множество примеров успешного использования клеток, бактерий, грибов, высших растений, млекопитающих, а также субклеточных органелл уже описано в литературе [2—12]. Некоторые примеры обсуждаются в данной книге (гл. 5—9).

Использование иммобилизованных клеток позволяет избежать необходимости выделения и очистки требуемых ферментов. Более того, поскольку ферменты функционируют в нативном окружении, их денатурация в процессе работы сводится к минимуму. Еще одним преимуществом использования клеток является также возможность регенерации кофакторов в подходящих условиях. Это расширяет число применяемых ферментов и позволяет осуществлять как процессы синтеза, так и процессы деградации. Более того, появляется возможность протекания многостадийных (т. е. последовательных) ферментативных реакций. Конечно, использование иммобилизованных клеток не лишено недостатков; при этом исследователи сталкиваются с рядом трудностей. Так, например, клеточная стенка, плазматическая или внутриклеточная мембрана могут препятствовать проникновению субстрата к соответствующему ферменту, а также диффузии продукта из клетки. Кроме того, возникает необходимость поддержания целостности клетки и удержания клеток в той фазе роста, в которой синтезируются требуемые ферменты. Наконец, из-за большого числа присутствующих в клетке ферментов (что в ряде случаев рассматривается как достоинство) возможно протекание нежелательных побочных реакций.

1.2. Применение иммобилизованных ферментов и клеток

Существуют по меньшей мере четыре области, в которых могут найти применение иммобилизованные ферменты и клетки, а именно: промышленность, охрана окружающей среды, различные анализы и производство лекарственных препаратов. Примерами первой области являются синтез аминокислот, антибиотиков, трансформация стероидов, производство сахарных сиропов и молочных продуктов. К применениям для охраны окружающей среды относятся обработка сточных вод и гидролиз городских, промышленных и сельскохозяйственных стоков, содержащих целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин. Помимо того что эти процессы имеют социальное значение, они выгодны с экономической точки зрения, так как при этом утилизируется энергия в форме метана или этанола. Поскольку препараты иммобилизованных ферментов и клеток являются гетерогенными системами, их нельзя использовать непосредственно как растворимые ферменты. Однако они идеально подходят для использования в реакторах с перемешиванием, через которые пропускают субстрат. Несомненным преимуществом таких реакторов является возможность многократного использования колонок и получения продукта, свобод-

ного от фермента. Иммобилизованные ферменты могут быть также использованы в качестве «ферментных электродов», например для измерения концентрации глюкозы или мочевины в биологических и других жидкостях (гл. 5). Мосбах и др. [5] разработали высокочувствительный метод определения активности иммобилизованных ферментов с использованием ферментного термистора, для которого не требуется оптически чистых растворов. Препараты микрокапсулированных ферментов были испытаны для лечения больных с генетическими нарушениями, у которых отсутствуют некоторые ферменты. Такие препараты могут быть использованы для улучшения пищеварения, удаления токсичных метаболитов, предотвращения роста опухолей. Можно надеяться, что помимо практического применения изучение включенных в носитель или инкапсулированных ферментов будет способствовать лучшему пониманию их функционирования *in vivo*.

2. Методы иммобилизации

2.1. Общие принципы

Иммобилизацию можно рассматривать как физическое разделение катализатора (клеток, клеточных фракций или ферментов) и растворителя, при котором молекулы субстрата и продукта могут легко обмениваться между фазами. Разделение катализатора и растворителя может быть достигнуто либо адсорбционным или ковалентным связыванием с нерастворимым органическим или неорганическим носителем (гл. 1 и 2), либо связыванием отдельных молекул катализатора друг с другом с образованием агрегатов или сополимеров. Недостатком таких методов иммобилизации является необходимость использования большого количества катализаторов. Кроме того, химическая модификация, которой подвергаются ферменты или клетки в процессе иммобилизации, может нежелательным образом изменить их каталитические и другие свойства. По этой причине многие исследователи, по выражению Нортонa [1], «предпочитают включение», когда клетки или ферменты отделяют от остального объема включением в носитель или инкапсулированием. Таким образом катализатор можно включать в полимерную сетку, например полиакриламидного геля или геля альгината кальция, путем проведения полимеризации или реакции поперечного сшивания геля в присутствии ферментов или клеток. Родственными методиками являются либо инкапсулирование в липсомы, наилоновые или коллоидные мембраны, либо их физическое отграничение от других компонентов в аппаратах для ультрафильтрации. Для облегчения работы с частицами, содержащими катализатор, им придают, если это возможно, сферическую форму.

При одностадийной катализируемой реакции иммобилизуют или подходящий фермент, или нежизнеспособные клетки, обладающие нужной активностью. В первом случае, чтобы увеличить степень включения и свести к минимуму утечку фермента, требуется высокая степень сшивки носителя. Однако при высокой степени сшивки может ограничиваться диффузия молекул субстрата и продукта внутрь частиц носителя и из них наружу. Эта проблема исчезает в случае иммобилизации клеток. Поскольку размеры клеток относительно велики, можно использовать носители с низкой степенью сшивки и, следовательно, с хорошими диффузионными свойствами. Для катализа многостадийных реакций, например превращения глюкозы в этанол, где регенерация и удержание кофакторов является обязательным условием, необходимо иммобилизовать живые клетки. В этом случае следует принимать во внимание возможное вредное влияние на жизнеспособность клеток сшивающих агентов. Нужно также позаботиться о подаче необходимого для данных клеток количества кислорода и об удалении диоксида углерода, образующегося в результате метаболической активности. Трудности, сопровождающие эти на первый взгляд простые требования, недавно были рассмотрены [12]. Включение живых клеток требует мягких условий иммобилизации; носитель должен при этом представлять собой систему открытых пор с хорошими условиями для газообмена. К сожалению, частицы носителя, полученные с учетом этих требований, обладают низкой прочностью. Этот фактор становится особенно важным при увеличении масштабов процесса. Несмотря на эти ограничения, процедуры с использованием иммобилизованных живых клеток представляют собой заманчивую альтернативу стандартной процедуре ферментации. Действительно, некоторые исследователи сообщают об увеличении производительности на порядок и более благодаря применению иммобилизованных клеток. К тому же в некоторых системах иммобилизованные клетки сохраняют жизнеспособность в течение многих месяцев.

2.2. Включение ферментов в полиакриламидный гель

Полиакриламид — носитель, чаще других используемый для включения ферментов, — не обладает ионообменными свойствами, поэтому при иммобилизации рН-профиль активности фермента практически не меняется. По этой же причине не происходит ни обогащения, ни обеднения носителя заряженными субстратами и продуктами. Однако отсутствие взаимодействия включенных белков с носителем не способствует их удержанию. Для устранения утечки требуется высокая степень сшивки носителя, т. е. желательна как можно более полная полимеризация (важным фактором в этом смысле является удаление кислорода из растворов). К сожалению, как было указано в разд. 2.1, при высокой степени

сшивки возникает проблема диффузионных затруднений, особенно при работе с крупными молекулами субстратов. Таким образом, хотя включение ферментов в полиакриламидный гель используется довольно широко, методы иммобилизации, такие как ковалентное связывание с инертным носителем, имеют по сравнению с ним определенные преимущества.

Опубликовано несколько методик включения ферментов в полиакриламидный гель. Методику, представленную в табл. 3-1, разработали Треван и Гровер [13] специально для иммобилизации уреазы, поэтому при иммобилизации других ферментов может возникнуть необходимость изменить pH и состав буферных растворов.

2.3. Включение клеток в полиакриламидный гель

Системы, подобные описанным выше в разд. 2.2, могут быть использованы для иммобилизации как жизнеспособных, так и

Таблица 3-1. Включение ферментов в полиакриламидный гель

1. Необходимые материалы:

Сухой препарат фермента или его концентрированный раствор
0,1 мМ ЭДТА, 0,1 М трис-HCl, pH 7,0
0,1 мМ ЭДТА, 0,5 М NaCl, 0,1 М трис-HCl, pH 7,0
N,N'-метиленбисакриламид (бисакриламид)
Акриламид
Диметиламинопропионитрил
Персульфат калия, свежеприготовленный раствор (10 мг/мл)
Источник азота
Шприц емкостью 5 или 10 мл с иглой диаметром около 0,5 мм
Система для фильтрации под вакуумом
Колба с пробкой (50 мл)

2. Приготовить следующие растворы:

Растворить 110 мг метиленбисакриламида и 1 г акриламида в 10 мл 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 М трис-HCl, pH 7,0, и поместить раствор в колбу. В этой смеси растворить фермент (около 15 мг).

3. Продувать азотом в течение 20 мин. Это необходимо для удаления кислорода, который мешает нормальному протеканию реакции полимеризации.

4. Добавить 0,2 мл диметиламинопропионитрила и осторожно перемешать.

5. Добавить 0,5 мл раствора персульфата калия (10 мг/мл) и осторожно перемешать. Закрывать колбу пробкой и оставить на 20 мин при комнатной температуре. На этой стадии образуется непрозрачный гель.

6. Измельчить гель сначала встряхиванием в колбе, а затем многократным пропусканием его через тонкую иглу шприца.

7. Промыть гель 50 мл 0,1 мМ ЭДТА, 0,5 М NaCl, 0,1 М трис-HCl, pH 7,0.

8. Повторить промывание трижды или до тех пор, пока в промывных растворах перестанет обнаруживаться значительная ферментативная активность.

9. Ресуспендировать гель, содержащий фермент, в 15 мл 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 М трис-HCl, pH 7,0. При правильно проведенной иммобилизации не должно наблюдаться утечки фермента из геля в раствор.

Таблица 3-2. Включение клеток в поперечно-сшитый и предварительно полимеризованный линейный полиакриламид

1. Необходимые материалы:
 Промытые клетки
 0,2 М калий-фосфатный буфер, pH 7,0
 Акриламид
 N,N'-метиленабисакриламид (бисакриламид)
 Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД)
 Персульфат аммония
 Скальпель
 Крупное чистое сито
 Стеклянные чашки Петри
2. Суспендировать около 5 г влажных клеток в 10 мл дистиллированной воды и охладить суспензию во льду.
3. Охладить 10 мл 0,2 М калий-фосфатного буфера, pH 7,0, во льду.
4. Добавить к буферу:
 2,85 г акриламида
 0,15 г бисакриламида
 10 мг персульфата аммония
 Перемешать до растворения этих веществ.
5. Сразу же смешать охлажденный буферный раствор с охлажденной суспензией клеток, вылить смесь в 2 или 3 чашки Петри и закрыть их крышками.
6. Инкубировать в течение 1 ч.
7. Суспендировать пропущенный через сито гель в 100 мл 0,2 М калий-фосфатного буфера, pH 7,0. Дать суспензии отстояться и удалить мелкие взвешенные частицы геля декантацией.

нежизнеспособных клеток. Однако при включении происходит снижение жизнеспособности клеток вследствие токсичности мономеров, используемых для получения полиакриламидного геля (т. е. акриламида и бисакриламида) и выделения тепла при полимеризации. Вместе с тем, если иммобилизованные клетки используются для катализа одностадийной реакции, потеря жизнеспособности не имеет существенного значения. Как уже обсуждалось в разд. 2.1, поскольку клетки значительно больше ферментов, высокая степень сшивки не обязательна. По этой причине были разработаны методы, в которых для иммобилизации клеток с хорошим сохранением жизнеспособности используется поперечно-сшитый и предварительно полимеризованный линейный полиакриламид [14]. Одна из таких методик приведена в табл. 3-2.

2.4. Включение клеток в гель альгината кальция

Альгинат — основной структурный полисахарид бурых морских водорослей — состоит из регулярных последовательностей, связанных между собой в положениях 1 и 4 остатков β -D-маннопиранозилуроната и α -L-гулопиранозилуроната [15]. Во всех молекулах альгината представлены обе гомополимерные последовательности, хотя и в разной степени. Обычно присутствуют также

Таблица 3-3. Включение клеток в гель альгината кальция

1. Необходимые материалы:

Раствор альгината натрия (4%, вес/объем) ¹⁾

0,2 М CaCl_2

Суспензия клеток (примерно 10—30 г сухого веса в 100 мл)

Шприц емкостью 10 мл с иглой диаметром 1 мм для формирования капель смеси или пипетка на 10 мл с диаметром выходного отверстия 3 мм

Магнитная мешалка

2. Осторожно смешать равные объемы раствора альгината натрия и суспензии клеток (для предварительных экспериментов подходят объемы по 50 мл).

3. С высоты около 20 см капать смесь из шприца емкостью 10 мл в избыток 0,2 М раствора CaCl_2 ²⁾. Для 100 мл смеси требуется 1 л раствора CaCl_2 .4. Оставить частицы альгината кальция с включенными в них клетками в растворе CaCl_2 на 20 мин для затвердевания.

¹⁾ Приготовление раствора альгината натрия может осложниться тем, что сухой альгинат вследствие своей гигроскопичности иногда образует плотные комки. Поэтому рекомендуется добавлять сухой альгинат в перемешиваемую воду и продолжать перемешивание в течение 1 ч, чтобы обеспечить полное растворение вещества. Раствор затем оставляют стоять в течение 30 мин для освобождения от захваченных пузырьков воздуха. Удаление пузырьков воздуха весьма существенно для последующей работы, поскольку при включении в частицы геля они приводят к всплыванию частиц и тем самым осложняют их использование.

²⁾ При желании можно получить гели в форме пластин или кубиков, наливая смесь альгината с клетками в соответствующую формочку и насаивая сверху раствор хлорида кальция (0,2—0,5 М). После образования геля прочность пластин или кубиков может быть повышена инкубацией в избытке 0,2 М хлорида кальция.

и смешанные последовательности, содержащие оба мономера. В присутствии моновалентных катионов полисахариды даже в низких концентрациях образуют вязкий раствор, тогда как в присутствии двухвалентных катионов, особенно кальция, наблюдается образование геля. Поскольку гель образуется в мягких условиях, в нем можно иммобилизовать живые клетки. Действительно, именно это применение альгината получило наиболее широкое распространение. В табл. 3-2 приведена методика иммобилизации, которую разработали Кирстен и Бьюк [16].

Если увеличивать концентрацию и альгината, и до определенной степени CaCl_2 , то образуется более плотно сшитый гель. Следует, однако, отметить, что с высокими концентрациями альгината трудно работать. В большинстве случаев наиболее подходящими являются концентрации, приведенные в табл. 3-3. При необходимости ионы кальция можно заменить другими двухвалентными катионами, например ионами бария.

Когда используют систему с альгинатом кальция, желательно во все растворы включать 10 мМ хлорид кальция. Важно также, чтобы в системе отсутствовали хелатирующие агенты, такие как фосфаты и цитраты, которые разрушают структуру геля, связывая кальций.

2.5. Включение клеток в гели κ -каррагинана

Каррагинаны представляют собой гетерогенные полисахариды, содержащие главным образом эфиры α -D-галактопиранозилсерной кислоты. κ -Каррагинан — это нерастворимая фракция, которую получают при добавлении ионов кальция к водному экстракту каррагинана. Стандартная процедура включения в такой гель, основанная на методах, которые разработали Тоза и др. [17] и Ванг и Хетвер [18], приведена в табл. 3-4.

Модификации этой методики позволяют получить образцы включенных в каррагинан клеток в виде мембран или кубиков. Для получения кубиков клетки суспендируют в 2%-ном (вес/объем) KCl, нагревают до 40°C и смешивают с двумя объемами раствора каррагинана также при 40°C. Эту смесь заливают в подходящую формочку, дают ей возможность отвердеть в течение 30 мин при 10°C и затем пропитывают 2%-ным (вес/объем) KCl при 10°C в течение 1 ч. Полученную пластину геля можно разрезать на кубики необходимого размера. Тонкие пленки и мембраны получают по такой же методике, если при 40°C смесь выливают в неглубокую плоскую кювету и дают ей возможность остыть. После этого на пленку осторожно наслаивают 2%-ный (вес/объем) KCl и оставляют для затвердевания, как описано выше. Разумеется, необходимым условием для выживания клеток при включении в гель каррагинана является их устойчивость при 40°C.

2.6. Включение клеток в гели агара

Препараты клеток, включенных в агар, обычно получают в виде сферических частиц, блоков геля или чаще всего мембран. Имобилизацию проводят в растворе, нагреваемом до температуры, при которой агар остается жидким. Затем добавляют клетки и охлаждают смесь для образования геля. Так же как и в случае каррагинана (разд. 2.5), клетки должны быть устойчивы к нагре-

Таблица 3-4. Включение клеток в κ -каррагинан ¹⁾

1. Необходимые материалы:

κ -Каррагинан (4%, вес/объем) растворить в 0,9%-ном (вес/объем) NaCl; нагреть до 60°C для растворения полисахарида и оставить при 40°C

KCl (3%, вес/объем) при комнатной температуре (18—20°C)

Суспензия клеток (~10—30 мг сухого веса на 100 мл)

2. Смешать теплый раствор каррагинана с суспензией клеток в отношении 9:1. Пока сохраняется температура 40°C, добавить смесь из шприца по каплям к раствору KCl.

3. Оставить образовавшиеся в растворе KCl частицы на 20 мин для затвердевания.

¹⁾ Получение частиц с помощью шприца аналогично получению частиц альгината кальция (разд. 2.4).

Таблица 3-5. Включение клеток в агар

1. Необходимые материалы:

Раствор агара: растворить 100 мг агара в 4,5 мл 0,9%-ного (вес/объем) NaCl нагреванием до 100 °C и затем охладить до 50 °C

Суспензия клеток в 0,9%-ном (вес/объем) NaCl (10—30 мг сухого веса на 100 мл)

Найлоновая сеточка (размер ячеек 100 меш) на стеклянной пластинке

2. Добавить 0,5 мл суспензии клеток к 4,5 мл раствора агара при 50 °C и перемешать смесь. Вылить смесь на найлоновую сеточку и охладить до 5 °C. До использования хранить образовавшуюся мембрану в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0.

ванию. Методика, описанная в табл. 3-5, основана на методе, разработанном для включения в агар клеток *Clostridium butyricum* [19].

2.7. Другие методы включения клеток в гели

Известно несколько других методик включения клеток в гели. Они не нашли широкого распространения, но представляют определенный интерес, например методика включения (в отличие от адсорбции) в гели кслагена и целлюлозы [20, 21].

2.8. Совместное включение ферментов и клеток

Наиболее часто встречающимся недостатком при использовании препаратов, полученных совместным включением в один и тот же носитель ферментов и клеток, является потеря фермента в результате диффузии. Этот недостаток можно ликвидировать с помощью предварительной иммобилизации фермента путем ковалентного связывания с подходящим носителем. После такого связывания клетки и иммобилизованный фермент совместно включают в выбранный носитель. Присущую этому подходу универсальность проиллюстрируем на следующем примере. Целлюлоза — полимер глюкозы — широко распространенный и постоянно возобновляемый потенциальный источник энергии. Для освобождения этой энергии нужно сначала гидролизовать целлюлозу до глюкозы, а затем превратить глюкозу в этанол. Для гидролиза требуется совместное действие эндоцеллюлаз, экзоцеллюлаз и β -глюкозидазы. Однако содержание последнего фермента в фильтратах культуры целлюлолитических грибов низкое. Следовательно, для протекания гидролиза в фильтраты следует внести β -глюкозидазу из других источников. Этого достигают с помощью системы, состоящей из целлюлозы, фильтратов культур, содержащих целлюлазы, и геля альгината кальция, в который совместно включены дрожжевые клетки и иммобилизованная β -глюкозидаза [22—24].

Таблица 3-6. Совместное включение дрожжей и иммобилизованной β -глюкозидазы в альгинат кальция

1. Необходимые материалы:
 1 г набухшей сефарозы 4 В, активированной бромцианом (Pharmacia Ltd.)
 2,8 мг частично очищенной β -глюкозидазы¹⁾, растворенной в 5 мл 0,1 М NaHCO₃, 0,5 М NaCl
 1 М этаноламин-HCl, pH 8,0
 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 4,0, 1 М NaCl
 0,1 М боратный буфер, pH 8,0, 1 М NaCl
 Реактивы, необходимые для включения клеток в гель альгината кальция (табл. 3-3).
2. Иммобилизовать β -глюкозидазу, используя следующий метод: к 1 г набухшей сефарозы 4В, активированной бромцианом²⁾, добавить 2,8 мг β -глюкозидазы в приведенном выше растворе и осторожно перемешивать в течение 2 ч.
3. Отделить носитель с ковалентно присоединенным ферментом от супернатанта декантацией или вакуумным фильтрованием и инкубировать носитель в 1 М этаноламин-HCl, pH 8,0, в течение 2 ч.
4. Промывать носитель, чередуя 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 4,0, 1 М NaCl, и 0,1 М боратный буфер, pH 8,0, 1 М NaCl, пока в промывных водах перестанет обнаруживаться ферментативная активность.
5. Приготовить смесь альгината натрия и клеток дрожжей, как описано в табл. 3-3.
6. Добавить к этой смеси иммобилизованную β -глюкозидазу, так чтобы ее содержание не превышало 10%.
7. Сформировать частицы геля альгината кальция, как описано в табл. 3-3.

¹⁾ Частично очищенная β -глюкозидаза из фильтрата культуры *Talaromyces emersonii* [23].

²⁾ Ли и Вудворд [25] предлагают также иммобилизовывать фермент на конканавалин А-сефарозе.

Методика совместного включения в гель дрожжевых клеток и иммобилизованной β -глюкозидазы [23] описана в табл. 3-6. Ее можно модифицировать для иммобилизации других клеток и ферментов.

3. Конструирование реактора

За исключением некоторых специальных случаев, чаще всего гель, в который включают клетки, состоит из сферических частиц, а не из волокна, мембран или блоков. Одностадийные биопревращения с использованием иммобилизованных ферментов или мертвых клеток осуществляют обычно в проточных реакторах с перемешиванием, в реакторах с псевдооживленным слоем или в реакторах с полыми волокнами (рис. 3-1). Каждая из этих систем имеет определенные ограничения в отношении величин перепадов давления и неравномерного распределения катализатора. Для увеличения площади поверхности и, следовательно, улучшения диффузии (которая в одностадийных реакциях является лимитирующим фактором) применяют малые сферические частицы одинакового размера. Однако, при этом увеличивается перепад давле-

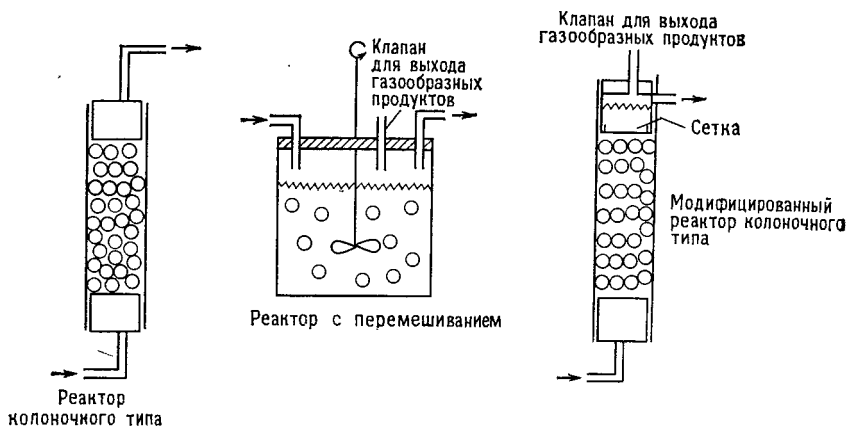


Рис. 3-1. Типы реакторов. В реакторе с перемешиванием можно использовать магнитную или подвесную мешалку. Модифицированный реактор колоночного типа предназначен для работы с препаратами иммобилизованных клеток, которые образуют газообразные продукты.

ния по длине колонки. Если используют иммобилизованные живые клетки, критическим фактором является диффузия газов, а не других компонентов реакции. Газ, выделяемый живыми клетками, может захватываться шариками, вызывая их всплывание и тем самым снижая их каталитическую активность. В этом случае не следует применять стандартный реактор колоночного типа, так как под давлением выделяющегося газа он может разрушиться. Чтобы избежать этого, реактор нужно модифицировать, как показано на рис. 3-1. На расстоянии 2—4 см ниже выпускного патрубка реактора устанавливают металлическую сетку с размером ячеек ~ 10 меш. Ее либо плотно вставляют в реактор, либо удерживают тремя-четырьмя металлическими удлинителями, упирающимися в верхнюю крышку реактора и не дающими сетке подняться. Реактор с перемешиванием, который можно использовать в непрерывном (проточном) режиме, более предпочтителен для проведения рутинных исследований в малом масштабе. Однако его производительность невелика, особенно если работать с большими объемами субстрата. Следует также помнить о возможности разрушения частиц геля при перемешивании. Во всех случаях рекомендуется проводить предварительное исследование с использованием непроточного реактора с перемешиванием, который легко сконструировать в обычной лаборатории.

Литература

1. Norton T. In: Calvin's Institutions of Christian Religion, preface, 1561.
2. Zaborsky O. R. In: Immobilised Enzymes, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1973.

3. *Chibata I., Tosa T.* Appl. Biochem. Bioeng., **1**, 329 (1976).
4. *Abbott B. J.* Adv. Appl. Microbiol., **20**, 203 (1976).
5. *Methods in Enzymology* (Mosbach K.), vol. 44, Academic Press, New York and London, 1976.
6. *Jack T. R., Zajic J. E.* Adv. Biochem. Eng., **5**, 125 (1977).
7. *Durand G., Navarro J. M.* Process Biochem., **13**, 14 (1978).
8. *Immobilized Microbial Cells* (Venkatsubramanian K., ed.), ACS Symposium Series 106, American Chemical Society, Washington DC, 1979.
9. *Trevan M. D.* In: *Immobilized Enzymes: An Introduction and Applications in Biotechnology*, Wiley, New York, 1980.
10. *Messing R. A.* Annu. Rep. Ferment. Processes, **4** 105 (1980).
11. *Brodelius P., Mosbach K.* Adv. Appl. Microbiol., **29**, 1 (1982).
12. *Immobilized Cells and Organelles* (Mattiasson B., ed.), vols. I and II, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982.
13. *Trevan M. D., Grover S.* Trans. Biochem. Soc., **7**, 28 (1979).
14. *Freeman A., Aharonowitz Y.* Biotechnol. Bioeng., **23**, 2747 (1981).
15. *Rees D. A., Morris E. A., Thom D., Madden J. K.* In: *The Polysaccharides* (Aspinall G. O., ed.), vol. 1, Academic Press, New York and London, 1982.
16. *Kierstan M. P. J., Bucke C.* Biotechnol. Bioeng., **19**, 387 (1977).
17. *Tosa T., Sato T., Mori T., Yamamoto K., Takata I., Nishida Y., Chibata I.* Biotechnol. Bioeng., **21**, 1697 (1979).
18. *Wang H. Y., Hettwer D. J.* Biotechnol. Bioeng., **24**, 1827 (1982).
19. *Matsunaga T., Karube I., Suzuki S.* Biotechnol. Bioeng., **22**, 2607 (1980).
20. *Constantinides A.* Biotechnol. Bioeng., **22**, 119 (1980).
21. *Linko Y.-Y., Viskari R., Pohjola L., Linko P. J.* Solid-Phase Biochem., **2**, 203 (1978).
22. *Hahn-Hägerdahl B.* In: *Immobilized Cells and Organelles* (Mattiasson B., ed.), vol. II, p. 79, CRC Press, Boca Raton, 1982.
23. *Kierstan M. P. J., McHale A., Coughlan M. P.* Biotechnol. Bioeng., **24**, 1461 (1982).
24. *Coughlan M. P., McHale A., Moloney A. P., O'Rourke A., Considine P. J., Kierstan M. P. J.* Trans. Biochem. Soc., **10**, 173 (1982).
25. *Lee J. M., Woodward J.* Biotechnol. Bioeng., **25**, 2441 (1983).

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ПУТЕМ МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЯ

*Герберт Э. Клей, Дональд У. Сандстрем
и Донгсеок Шим*

1. Введение

В отличие от других методов иммобилизации, рассмотренных выше, при микрокапсулировании главным является удержание раствора, окружающего фермент, а не создание физических и химических сил, необходимых для иммобилизации. Иммобилизуется целиком исходный раствор, содержащий фермент, а не отдельные молекулы фермента. При микрокапсулировании используют искусственные клетки с мембранами, подобными мембранам природных клеток. С помощью мембран осуществляется контроль размеров молекул, проникающих внутрь клетки или выходящих из нее. Большие молекулы, такие как ферменты или белки, удерживаются внутри микрокапсулы, тогда как малые молекулы субстрата и продукта могут свободно диффундировать через синтетическую мембрану. Одним из преимуществ микрокапсулирования перед равномерным включением фермента является большая площадь поверхности, приходящаяся на единицу активности иммобилизованного фермента, что позволяет использовать высокие концентрации фермента в исходном растворе и достигать высокой эффективности действия иммобилизованного фермента. Поскольку присутствие в растворе фермента не влияет на процесс образования мембран, можно одновременно подвергать микрокапсулированию различные ферменты, клетки или биомолекулы, что позволяет осуществлять многостадийные реакции.

Сам по себе принцип создания полимерной мембраны вокруг раствора фермента с образованием микрокапсулы весьма привлекателен, но чтобы получить микросферы, однородные по размеру, и обеспечить высокую активность фермента внутри них, требуются значительные технологические ухищрения. В настоящее время микрокапсулированные продукты уже существуют в виде коммерческих препаратов, причем их внутреннее содержимое обычно представляет собой либо органический растворитель, содержащий масло или духи, либо водную среду, но они не обладают каталитической активностью. Большие усилия предпринимаются по изучению контролируемого высвобождения лекарств из микрокапсул [1, 2].

Диаметр микросфер может быть от нескольких микрон до нескольких тысяч микрон, а толщина мембраны — от сотен ангстрем до нескольких микрон [1, 3]. Можно микрокапсулировать в раз-

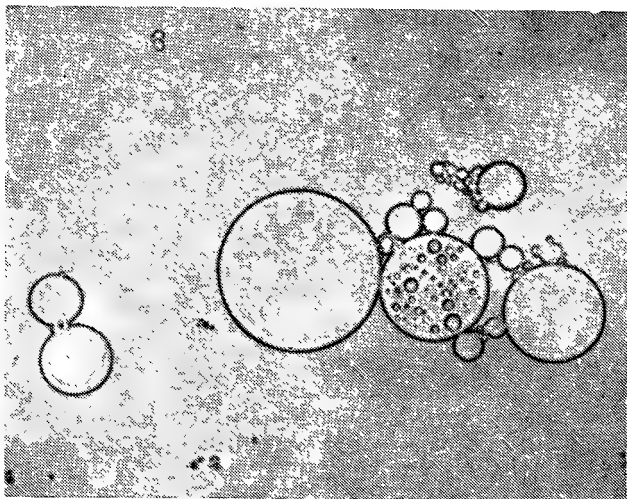


Рис. 4-1. Каталаза, микрокапсулированная в мембрану из бутадиенового каучука. Внутри большой капсулы находятся маленькие.

личных сочетаниях ферменты, кофакторы с соответствующими ферментами для их регенерации, белки, целые клетки, ионообменные смолы, частицы активированного угля и магнитные частицы. Возможно заключение маленьких микрокапсул в большие, как это показано на рис. 4-1, где маленькие микросферы, содержащие каталазу, включены в большие микросферы с мембраной из бутадиенового каучука.

2. Методы микрокапсулирования

2.1. Применение микрокапсулирования для ферментов и биохимических систем

Различные ферменты и кофакторы можно заключать в капсулы, ограниченные мембраной, без потери активности по отношению к субстратам, диффундирующим внутрь капсулы. Сохраняющаяся при этом активность, как правило, заметно ниже, чем активность свободных ферментов (табл. 4-1). Дело в том, что при инкапсулировании ферменты соприкасаются с органическим растворителем и мономерами, которые могут их легко денатурировать. Чтобы предохранить фермент от инактивации, перед микрокапсулированием его обычно смешивают с полимерами, такими как бычий сывороточный альбумин (БСА) [12], гемоглобин [1] или полиэтиленмин (ПЭИ) [10]. Было исследовано влияние некоторых водорастворимых полимеров: БСА, поливинилпирроли-

Таблица 4-1. Микрокапсулированные ферменты и кофакторы

Фермент	Мембрана	Сохранение активности после микрокапсулирования, %	Время полупинактивации	Температура, °C	Источник данных
Уреаза	Ацетатбутират целлюлозы	20	>1 мес	25	[4]
	Нитрат целлюлозы	37	1 нед	37	[5, 6]
	Липид—полнамид				[7]
β-Галактозидаза	Нитрат целлюлозы	99			[8]
Каталаза	Нитрат целлюлозы	99	1,3 сут	37	[1, 9]
NADP ⁺	Липид — полп-амид				[7]
NAD ⁺	ПЭИ — найлон		10 сут	4	[10]
Дегидрогеназа	ПЭИ — найлон		10 сут	4	[10]
Аргиназа	Найлон	32	>16 сут	37	[11]
	Полифталойлпи-перазин	12	>60 сут	4	[12]
	Эпоксидный поли-мер	14			[1]
Химотрипсин	ПЭИ — найлон				[1]
Аспарагиназа	Нитрат целлюлозы	99	5 сут	37	[1]

дона (ПВП), поливинилового спирта (ПВС), полиэтиленгликоля (ПЭГ), декстрана и гепарината натрия, на сохранение активности аргиназы при микрокапсулировании [13]. Оказалось, что БСА, ПВП, ПВС и ПЭГ, как правило, способствуют сохранению активности аргиназы, тогда как присутствие декстрана и гепарината натрия не оказывает никакого влияния. Вероятно, гидрофобные участки полимеров первой группы экранируют молекулу фермента и тем самым защищают ее в процессе микрокапсулирования. Последние два полимера, будучи слишком гидрофильными, не способны оказывать защитного действия. Для сохранения активности существенным фактором является также концентрация полимера. Показано, что активность аргиназы лучше всего сохраняется при концентрации БСА 1% (вес/объем) [12]. Концентрация белка или другого полимера важна также для поддержания осмотического давления.

Концентрация эмульгатора, используемого для образования микросфер в органическом растворителе, также заметно влияет на сохранение активности фермента. Активность микрокапсулированной аргиназы быстро падает до нуля при снижении концентрации эмульгатора Span 85 с 0,1 до 0,01% (по объему) [12]. При его концентрациях выше 0,1% (по объему) активность остается постоянной, что свидетельствует о существовании критической концентрации, необходимой для полного покрытия поверхности

капелек водной фазы, благодаря которому фермент предохраняется от непосредственного контакта с органическим растворителем. Непрерывная регенерация кофакторов внутри микрокапсулы может быть обеспечена их предварительным присоединением к декстрану, после чего они уже не способны диффундировать через мембрану [7, 10].

В результате микрокапсулирования константа Михаэлиса — Ментен обычно увеличивается. Для уреазы K_m изменяется от 3 мМ для свободного фермента до 8 мМ для микрокапсулированного. После хранения в течение 16 сут при 4°C эта величина возрастает до 0,14 М [6]. K_m аргиназы после микрокапсулирования возрастает примерно на 50% [11]. В общем случае увеличение K_m обычно означает увеличение сопротивления массопереносу внутрь частицы, обусловленное либо собственно мембраной, либо пограничными слоями частицы [14].

2.2. Методики эксперимента

Физические и химические свойства микрокапсулированных ферментов зависят от природы полимера, из которого формируется микрокапсула. Полимер должен обладать когезионными свойствами, обеспечивающими образование непрерывной пленки, быть проницаемым для субстрата и инертным по отношению к реакционной среде. Вещества для получения микрокапсул выбирают из природных и синтетических полимеров. Чаще других используют карбоксиметилцеллюлозу, нейлон, нитрат целлюлозы, желатину, силиконированный каучук, ацетатфталат целлюлозы, эпоксидные смолы, полиуретаны, гуммиарабик, стирол и полиамиды.

В литературе описано несколько методов микрокапсулирования [1] для ферментных систем, однако чаще всего используют коацервацию и межфазную полимеризацию. Коацервация включает фазовое разделение коллоидных частиц полимера, которые ассоциируют вокруг маленьких водных капель и затем образуют непрерывную мембрану при их коалесценции. Так как при коацервации не происходит химических реакций, ее можно широко применять для инкапсулирования многих биохимических препаратов и получения очень тонких мембран [1]. Типичными полимерами для коацервации являются нитрат целлюлозы, ацетат целлюлозы и бутадиеновый каучук. Микрокапсулирование включает следующие стадии.

1. Растворение фермента в буферном растворе, обычно содержащем для защиты фермента от денатурации другие белки, например альбумин.

2. Приготовление органической фазы, содержащей небольшое количество эмульгирующего агента, например Span 85. Органическая фаза не должна смешиваться с водой. Обычно это эфир, циклогексан или толуол.

Таблица 4-2. Методика микрокапсулирования каталазы бутадиеновым каучуком

1. Приготовить следующие 4 смеси:

Смесь А: 2,60 г Span 85¹⁾

25 мл циклогексана

Смесь Б: 1,0 мл раствора каталазы (650 ед./мл) в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,0*Смесь В:* 0,1 г бутадиенового каучука

50 мл циклогексана (перемешивать в течение 1—2 ч до полного растворения)

Смесь Г: 15 мл циклогексана

10 мл растительного масла

2. При непрерывном перемешивании добавить смесь А к смеси Б.

3. Не прекращая перемешивания, добавить смесь В.

4. Добавить смесь Г (с перемешиванием).

5. Не прекращая перемешивания, создать вакуум 26 мм рт. ст. для упаривания циклогексана. Упаривание не должно быть слишком быстрым, иначе вместо водных микросфер образуются полимерные частицы.

6. Отцентрифугировать масляную фазу, содержащую микрокапсулы, и удалить супернатант (масло). Добавить к осадку 15 мл фосфатного буфера, ресуспендировать частицы и еще раз отцентрифугировать. Удалить супернатант и повторить процедуру промывки еще несколько раз.

7. Ресуспендировать микрокапсулы²⁾ в буферном растворе, содержащем твин 20, для предотвращения их агрегации.

¹⁾ Span 85 можно приобрести у фирмы Imperial Chemical Industries (Великобритания и США).

²⁾ Ферментативную активность микрокапсул с каталазой можно определить, добавив определенный объем суспензии микрокапсул к раствору пероксида водорода и регистрируя снижение концентрации этого реагента.

3. Добавление водного раствора фермента к органической фазе, перемешивание в течение заданного времени с определенной скоростью вращения мешалки. От скорости перемешивания зависит размер микрокапсул.

4. Добавление к этой двухфазной смеси второго органического раствора. Этот раствор содержит полимер и органический растворитель — один из тех, которые перечислены на стадии 2. При добавлении второго органического раствора происходит образование мелкого коллоида, обусловленное разбавлением органического растворителя.

5. При упаривании растворителя из органической фазы происходит дальнейшее осаждение с образованием более плотной мембраны. Толщина мембраны зависит от количества полимера, добавленного к органической фазе, и времени преципитации.

6. Выделение маленьких микрокапсул из органической фазы седиментацией или центрифугированием и промывка буферным раствором, содержащим твин 20.

Концентрации веществ и времена протекания процессов, являющиеся очень существенными факторами для эффективного микрокапсулирования, можно найти в литературе [1, 2, 8, 15]. Ме-

тодика получения микрокапсулированной каталазы приведена в табл. 4-2.

Согласно методике с использованием межфазной полимеризации, один из реагентов находится в водной, а другой в органической фазе. На границе раздела фаз происходит реакция полимеризации и вокруг водных капель, диспергированных в органической фазе, образуется слой полимера. Типичным примером межфазной реакции является образование найлона. Водная система, содержащая фермент, буфер и альбумин, в данном случае содержит еще и диамин, например 1,6-гексаметилендиамин. Органический раствор содержит эмульгатор Span 85 и смесь хлороформа и циклогексана. После образования эмульсии добавляют (при перемешивании) себацилхлорид в смеси хлороформа с циклогексаном. Перемешивают в течение нескольких минут, микрокапсулы отделяют центрифугированием и промывают водным раствором, содержащим твин 20. Недостатком метода является возможность реакции между диамином и ферментом в водной фазе. Как и в предыдущем случае, для получения активных иммобилизованных ферментов большое значение имеют концентрации веществ и времена реакций, которые можно найти в литературе [15, 16]. С помощью межфазной полимеризации на поверхности раздела фаз могут быть также получены пленки из эпоксидных смол и полиуретана.

3. Массоперенос

Наличие сопротивления массопереносу через мембрану может являться ограничением при практическом использовании микрокапсулированных ферментов. Диффузия через мембрану, а также через неперемешиваемые пограничные слои, расположенные внутри и снаружи микрокапсулы, зачастую лимитирует скорость функционирования фермента. Влияние скорости диффузии через мембрану отражается в увеличении K_m микрокапсулированного фермента. Это увеличение можно компенсировать, повысив концентрацию субстрата в проточном реакторе с перемешиванием [17]. Для микрокапсулированной β -галактозидазы фактор эффективности составляет 0,3—0,7 и коррелирует с диффузионными свойствами мембраны [16]. Как было обнаружено, выход веществ из микрокапсулы определяется скоростью массопереноса через наружный неперемешиваемый слой, что подтверждается его зависимостью от скорости перемешивания [18]. Кроме того, полученные результаты хорошо согласуются с моделью внешнедиффузионного торможения [19].

Не исключено, что внутри микрокапсул может оказаться слишком много фермента, так что субстрат не будет успевать диффундировать через внешний граничный слой, и поэтому не будет достигаться максимально возможная скорость функционирования

заклученного в капсулу фермента. В случае микрокапсулированной карбоангидразы, например, ее активность была настолько велика, что фактор эффективности составлял лишь 0,003 [20]. Немаловажное значение имеет перемешивание внутри микрокапсулы, и в некоторых случаях скорость транспорта веществ, согласно теоретической модели проницаемости, изменяется пропорционально квадратному корню из времени реакции [21]. Все варианты сопротивления массопереносу были объединены в унифицированной модели для микрокапсул, которую применили, в частности, для описания свойств микрокапсулированной уреазы [22]. В общем случае эта унифицированная модель требует подстройки некоторых параметров к экспериментальным данным; в случае кинетики Михаэлиса — Ментен необходимо решение на компьютере методом проб и ошибок.

Литература

1. *Chang T. M. S.* In: *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins* (Chang T., ed.), p. 69, Plenum Press, New York, 1977.
2. *Patwardhan S. A., Das K.* In: *Controlled-Release Technology, Bioengineering Aspects* (Das K., ed.), p. 122, Wiley and Sons, New York, 1983.
3. *Madan P. L.* In: *Microencapsulation — New Techniques and Applications* (Kondo T., ed.), p. 11, Techno Inc., Tokyo, 1979.
4. *Gardner D. L., Emmerling D. C.* In: *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins* (Chang T., ed.), p. 163, Plenum Press, New York, 1977.
5. *Chang T. M. S.* In: *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins* (Chang T., ed.), p. 147, Plenum Press, New York, 1977.
6. *Artmanis A., Neufeld R. J., Chang T. M. S.* *Enzyme Microb. Technol.* 6, 135 (1984).
7. *Yu T. T., Chang M. S.* *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 327 (1982).
8. *Wadiak D. T., Carbonell R. G.* *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 1157 (1975).
9. *Magensen A., Vieth W.* *Biotechnol. Bioeng.*, 15, 467 (1973).
10. *Grunwald J., Chang T. M. S.* *J. Mol. Catal.*, 11, 83 (1981).
11. *O'Grady P., Joyce P.* *Enzyme Microb. Technol.*, 3, 149 (1981).
12. *Kondo T., Muramatsu N.* In: *Microencapsulation* (Nixon J. R., ed.), p. 67, Marcel Dekker, Inc., New York, 1976.
13. *Yanagibashi N., Arakawa M., Kondo T.* In: *Microencapsulation* (Kondo T., ed.), p. 325, Techno Inc., Tokyo, 1979.
14. *Moo-Young M., Kabayashi T.* *Can. J. Chem. Eng.*, 50, 162 (1972).
15. *Chang T. M. S., MacIntosh F. C., Mason S. G.* *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 44, 115 (1976).
16. *Wadiak D. T., Carbonell R. G.* *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 1157 (1975).
17. *Artmanis A., Neufeld R. J., Chang T. M. S.* *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 135 (1984).
18. *Nang L. S., Carlier P. F.* In: *Microencapsulation* (Nixon J. R., ed.), p. 185, Marcel Dekker Inc., New York, 1976.
19. *Takenaka H., Kawashima N., Saitoh M., Ishibashi R.* In: *Microencapsulation* (Tamotsu K., ed.), p. 35, Techno Inc., Tokyo, (1979).
20. *Dean D. N., Fuchs M. J., Schaffer J. M., Carbonell R. G.* *Ind. Eng. Chem. Fund.*, 16, 452 (1977).
21. *Bennett C. O., Myers J. E.* In: *Momentum, Heat and Mass Transfer*, McGraw-Hill, New York, 1974.
22. *Vieth W. R., Mendiratta A. K., Mogensen A. O., Saini R., Venkatasubramanian K.* *Chem. Eng. Sci.*, 28, 1013 (1973).

ФЕРМЕНТНЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ

Жорж Ж. Гильбо и Грацилиано де Оливера Нето

1. Введение

Ферментный электрод — это комбинация датчика, основанного на использовании ионселективного электрода, с иммобилизованным (нерастворимым) ферментом, обеспечивающая высокоселективный и высокочувствительный метод определения данного субстрата.

Кларк и Лайон [1] первыми ввели понятие ферментного электрода с использованием растворимого фермента, а Апдайк и Хикс [2] впервые сообщили об измерении концентрации глюкозы в биологических растворах и тканях с помощью электрода, в котором использовали глюкозооксидазу, иммобилизованную в геле на поверхности полярографического кислородного электрода. Эти электроды были датчиками вольтамперометрического или амперометрического типа, т. е. они позволяли измерять ток при наложении постоянного напряжения. Первый потенциометрический ферментный электрод (который позволяет измерять разность потенциалов, возникающую в системе в отсутствие внешнего приложенного напряжения) описали Гильбо и Монталво [3] в 1969 г. для определения концентрации мочевины. С того времени в литературе появились описания более 100 различных электродов; краткие сведения о них можно найти в работе [4] и табл. 5-1.

В ферментном электроде фермент обычно используют в иммобилизованном виде. Благодаря этому снижается его количество, необходимое для рутинных анализов, и устраняется необходимость частого определения активности ферментного препарата, что необходимо для получения воспроизводимых результатов. Кроме того, при включении в подходящий гель зачастую повышается стабильность фермента. Так, например, электрод для определения глюкозы, изготовленный с помощью ковалентного присоединения глюкозооксидазы, работал более 300 сут [5].

Для иммобилизации ферментов можно использовать один из двух методов: 1) химическую модификацию молекул фермента путем введения групп, обеспечивающих нерастворимость, и 2) физическое включение фермента в инертный носитель, например крахмал или полиакриламид. Электродные датчики лучше получать с помощью первого метода.

2. Рабочие параметры электродов

Действие ферментного электрода протекает в пять стадий:

- 1) перенос субстрата к поверхности электрода;
- 2) диффузия субстрата через мембрану к активному центру фермента;
- 3) реакция в активном центре;
- 4) перенос продукта ферментативной реакции через мембрану к поверхности электрода;
- 5) измерение концентрации продукта у поверхности электрода.

Скорость первой стадии — переноса субстрата — сильнее других зависит от скорости перемешивания раствора: при интенсивном перемешивании субстрат быстро доставляется к поверхности электрода. В случае фермента с высокой активностью мембрана может быть очень тонкой; при этом влияние стадий 2) и 4) сводится к минимуму или вообще устраняется. Поскольку стадия 3) очень быстрая, время отклика электрода теоретически должно приближаться ко времени отклика основного датчика. Многие исследователи показали, что это достигается при использовании тонких мембран и интенсивном перемешивании. В качестве примера на рис. 5-1 сравниваются параметры ферментного электрода для определения амигдалина с использованием β -глюкозидазы. В левой части рис. 5-1 приведены данные из работы [6] при значении pH, оптимальном для цианидного датчика, т. е. при pH 9,0. Поскольку свободный ион цианида присутствует только при высо-

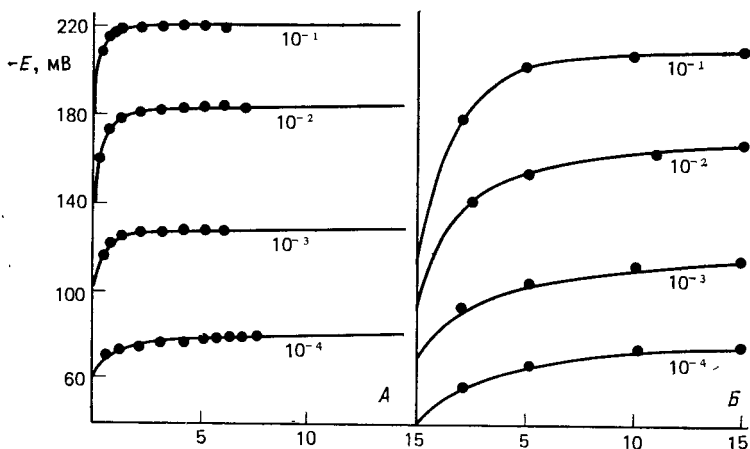


Рис. 5-1. Кинетика отклика электрода, содержащего 1 мг β -глюкозидазы, которая была иммобилизована физическим удерживанием с помощью диализной мембраны, при разных концентрациях амигдалина. А. При pH 7,0. Б. При pH 10,0. Перепечатано из работы [6] с разрешения издательства.

Таблица 5-1. Типичные ферментные электроды и их параметры

Определяемое вещество	Фермент	Датчик	Метод иммобилизации ¹⁾	Стабильность	Время реакции	Количество фермента, ед.	Диапазон концентрации, моль/л ²⁾
1. Мочевина	Уреаза (КФ 3.5.1.5)	Катодный » pH-электрод Газовый (NH ₃) » Газовый (CO ₂) pH-электрод	Физический » Химический Физический Химический » Физический Растворимый фермент	3 нед 2 нед >4 мес 3 нед 4 мес 20 сут 3 нед 1 нед	30—60 с 1—2 мин 1—2 мин 5—10 мин 2—4 мин 1—4 мин 1—2 мин 5—10 мин	25 75 10 100 10 0,5 25 100	10 ⁻² —5·10 ⁻⁵ 10 ⁻² —10 ⁻⁴ 10 ⁻² —10 ⁻⁴ 5·10 ⁻² —5·10 ⁻⁵ 5·10 ⁻² —5·10 ⁻⁵ 10 ⁻² —10 ⁻⁴ 10 ⁻² —10 ⁻⁴ 10 ⁻¹ —10 ⁻³
2. Глюкоза	Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4)	Pt(H ₂ O ₂) » »	Физический » Химический	6 мес >14 мес	12 с, кинетический режим ³⁾ 1 мин, стационарный режим	10 10	2·10 ⁻² —10 ⁻⁴ 2·10 ⁻² —10 ⁻⁴
3. L-Аминокислоты ⁵⁾	Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4) и каталаза (КФ 1.11.1.6) Оксидаза L-аминокислот (КФ 1.4.3.2)	Pt (хингидрон) Pt(O ₂) I— Газовый (O ₂) Газовый (O ₂) » Pt(H ₂ O ₂)	Растворимый фермент » Химический » Физический Химический »	1 нед ⁴⁾ >4 мес >1 мес 3 нед >3 нед 4—6 мес	3—10 мин 1 мин 2—8 мин 2—5 мин 2—5 мин 12 с, кинетический режим ³⁾	10 10 10 20 10 10	2·10 ⁻² —10 ⁻³ 10 ⁻¹ —10 ⁻⁵ 10 ⁻³ —10 ⁻⁴ 10 ⁻² —10 ⁻⁴ 2·10 ⁻² —10 ⁻⁴ 10 ⁻³ —10 ⁻⁵

L-Тирозин	L-Тирозиндекса- р-боксилаза (КФ 1.1.25)	Газовый (O ₂) Pt(O ₂) Катионный NH ₄ ⁺ I- Газовый (CO ₂)	» » Физический Химический » Физический	>4 мес 2 нед >1 мес >1 мес 3 нед	2 мин 1 мин 1—2 мин 1—3 мин 1—2 мин	10 10 10 10 10 25	10 ^{-2—10⁻⁴} 10 ^{-2—10⁻⁴} 10 ^{-2—10⁻⁴} 10 ^{-2—10⁻⁴} 10 ^{-3—10⁻⁴} 10 ^{-1—10⁻⁴}
L-глутамин	L-Глутамин L-Глутамин (КФ 3.5.1.2)	Катионный	Растворимый фер- мент	2 сут ⁴⁾	1 мин	50	10 ^{-1—10⁻⁴}
L-Глутамино- вая кислота	Глутаматдегидро- геназа (КФ 1.4.1.3)	»	»	2 сут ⁴⁾	1 мин	50	10 ^{-1—10⁻⁴}
L-Аспаргин	Аспарагиназа (КФ 3.5.1.1)	»	Физический	1 мес	1 мин	50	10 ^{-2—5·10⁻⁵}
4. D-Аминокис- лоты ⁶⁾	Оксидаза D-амино- кислот (КФ 1.4.3.3)	»	»	1 мес	1 мин	50	10 ^{2—5·10⁻⁵}
5. Молочная кислота	Лактатдегидроге- наза (КФ 1.1.1.27)	Pt([Fe(CN) ₆] ⁴⁻)	Растворимый фер- мент	<1 нед	3—10 мин	2	2·10 ^{-3—10⁻⁴}
6. Янтарная кислота	Сукцинатдегид- рогеназа (КФ 1.3.99.1)	Pt(O ₂)	Физический	1 нед	1 мин	10	10 ^{2—10⁻⁴}
7. Уксусная, муравьиная 8. Спирты ⁷⁾ кислоты	Алкогольоксидаза (КФ 1.1.3.13)	Pt(O ₂)	Химический	>4 мес	30 с	10	10 ^{-1—10⁻⁴}
	Алкогольоксидаза (КФ 1.1.3.13)	Pt(H ₂ O ₂)	Растворимый фер- мент	1 нед	12 с, кинетический режим ³⁾	10	0,5—100 мг %
9. Пенициллин	Пенициллиназа (КФ 3.5.2.6)	Pt(H ₂ O ₂) Pt(O ₂) pH-Электрод	» Химический Физический Растворимый фер- мент	1 сут ⁴⁾ >4 мес 1—2 нед 3 нед	1 мин 30 с 0,5—2 мин 2 мин	1 10 400 1000	0,5—50 мг % 0,5—100 мг % 10 ^{-2—10⁻⁴} 10 ^{-2—10⁻⁴}

Определяемое вещество	Фермент	Датчик	Метод иммобилизации ¹⁾	Стабильность	Время реакции	Количество фермента, ед.	Диапазон концентраций, моль л ²⁾
10. Мочевая кислота	Уратоксидаза (КФ 4.7.3.3)	Pt(O ₂)	Химический	4 мес	30 с	10	10 ⁻² —10 ⁻⁴
11. Амигалин	β-Глюкозидаза (КФ 3.2.1.21)	CN ⁻	Физический	3 сут ⁷⁾	10—20 мин	100	10 ⁻² —10 ⁻⁵
12. Холестерол	Холестероксидаза (КФ 1.1.3.6)	Pt(H ₂ O ₂)	Растворимый фермент		2 мин		10 ⁻² —10 ⁻⁴
13. Фосфатаза	Фосфатаза/глюкозооксидаза (КФ 3.1.3.1/1.1.3.4)	Pt(O ₂)	Химический	4 мес	1 мин	10	10 ⁻² —10 ⁻⁴
14. Нитрат	Нитратредуктаза/нитритредуктаза (КФ 1.9.6.1/1.6.6.4)	NH ₄ ⁺	Растворимый фермент		2—3 мин	10	10 ⁻² —10 ⁻⁴
15. Нитрит	Нитритредуктаза (КФ 1.6.6.4)	NH ₃ (газовый)	Химический	3—4 мес	2—3 мин	10	5·10 ⁻² —10 ⁻⁴
16. Сульфат	Арилсульфатаза (КФ 3.1.6.1)	Pt	»	1 мес	1 мин	10	10 ⁻¹ —10 ⁻⁴

¹⁾ Термин «физический» во всех случаях означает включение в полиакриламидный гель; «химический» — химическое присоединение к альбумину, модифицированному глутаровым альдегидом, к полиакриловой кислоте или акриламиду с последующим физическим включением.

²⁾ Диапазон концентраций, в котором можно проводить аналитические измерения либо на линейном участке зависимости «отклик — концентрация», либо на нелинейном, но с достаточно высокими значениями тангенса угла наклона кривой.

³⁾ Термин «кинетиический режим» означает измерение скорости изменения тока через 12 с от начала анализа; «стационарный режим» — измерение максимального значения тока, которое устанавливается за 1 мин.

⁴⁾ Препарат фермента не стабилен, что проявляется в экспоненциальном снижении сигнала.

⁵⁾ Электрод чувствителен к L-цистеину, L-лейцину, L-тироину, L-триптофану, L-фенилаланину и L-метионину.

⁶⁾ Электрод чувствителен к D-фенилаланину, D-аланину, D-валину, D-метионину, D-лейцину, D-норлейцину и D-изолейцину.

⁷⁾ Перед следующим измерением требуется время для возвращения сигнала к базовой линии.

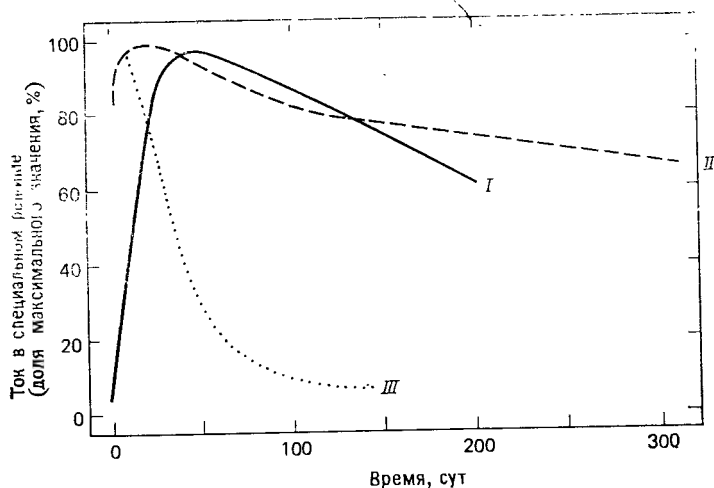


Рис. 5-2. Долговременная стабильность глюкозных электродов при измерениях тока в стационарном режиме. Глюкозооксидаза была иммобилизована физическим включением (I), ковалентным связыванием с использованием глутарового альдегида (II), ковалентным связыванием с использованием азосочетания (III).

ком значении pH (9 или 10), полагали, что наибольшая чувствительность электрода наблюдается именно при этом значении pH. Однако при этом скорость ферментативной реакции сильно снижается и накопление продукта (цианида) становится медленным. При значении pH, оптимальном для ферментативной реакции (хотя равновесная концентрация цианида и низка), отклик электрода становится практически мгновенным, поскольку слой фермента находится в очень тесном контакте с основным датчиком. Это было установлено и во многих других случаях, например в работе [7], где было показано, что в случае гидролиза мочевины, катализируемого уреазой, концентрация ионов аммония, высвобождающихся в результате этой реакции, определялась более эффективно при pH 7,0 или 7,5, чем при pH 9,0 или 10,0, поскольку скорость реакции гораздо выше при более низких значениях pH. Следует отметить еще один момент, который часто упускают из виду при использовании ионселективных электродов, а именно, что скорость перемешивания не только способствует более быстрому отклику ферментного электрода или любого другого датчика, но влияет также на величину измеряемого равновесного потенциала или равновесного значения pH. Это весьма существенный момент: перемешивание необходимо вести с постоянной скоростью, в противном случае каждый раз будут регистрироваться разные значения потенциала.

Стабильность электрода зависит от способа иммобилизации фермента. В литературе имеется масса данных по иммобилизации фермента, допускающих неоднозначное толкование результатов. Некоторые исследователи длительное время хранят электроды в сухом состоянии, а затем сообщают о фантастически долгом сроке работы электрода. На самом же деле параметры иммобилизации и стабильность фермента должны определяться раздельно в двух вариантах: при хранении в сухом состоянии и при использовании электрода. Большинство растворимых ферментов, за исключением некоторых препаратов глюкозооксидазы, которые весьма стабильны в неочищенном виде, в среднем способны сохранять активность в течение недели или в течение 25—50 анализов. (Необходимо, конечно, учитывать, что при использовании растворимых ферментов существуют проблемы, не встречающиеся при использовании иммобилизованных ферментов.) Ферменты, иммобилизованные физическим включением в гель, способны сохранять активность 3—4 нед, что эквивалентно возможности проведения 50—200 анализов. Для ковалентно иммобилизованного фермента этот диапазон составляет 200—1000 анализов. Эти значения неоднократно были получены как в наших, так и в других работах. Кроме того, в настоящее время имеются очень стабильные коммерческие препараты ферментов, связанных с нейлоновыми трубками (такие, например, как выпускаемые фирмой Technicon для использования в анализаторах типа SMAC или Auto Analyser, выпускаемые фирмой Boehringer, а также выпускаемые фирмой Miles под коммерческим названием Catalink). Эти трубки можно использовать более чем для 10 000 измерений.

Стабильность электрода определяется также содержанием фермента в геле, правильным подбором, как уже отмечалось, оптимальных условий эксплуатации и стабильностью самого датчика, на основе которого сделан электрод. На рис. 5-2 приводятся данные по стабильности электродов, изготовленных с использованием глюкозооксидазы, иммобилизованной разными способами: включением в гель и ковалентным связыванием с использованием глутарового альдегида или азосочетания. Ковалентное связывание предпочтительнее по двум причинам: а) оно позволяет изменять рабочий диапазон pH; б) оно обеспечивает лучшее связывание любого фермента; это будет продемонстрировано ниже на примере исследований, связанных с определением холестерина.

Помехи могут создаваться как самим датчиком, так и благодаря присутствию других субстратов фермента. Так, например, при использовании в электроде для определения уксусной кислоты алкогольоксидазы помехой является природный субстрат — этанол. В этой же роли могут выступать ингибиторы фермента. Вообще следует отметить, что иммобилизация фермента заметно повышает его чувствительность к факторам окружающей среды.

3. Экспериментальная часть

3.1. Аппаратура

После изготовления ферментный электрод используют как любой другой ионселективный электрод. Типичная аппаратура для этого схематически изображена на рис. 5-3.

Потенциометрические датчики, например электроды для определения мочевины, аминокислот, пенициллина, подключают непосредственно к цифровому вольтметру (их выпускают фирмы Orion, Corning, Sargent и др.). После этого строят график зависимости потенциала в милливольтх (мВ) от концентрации определяемого вещества в полулогарифмических координатах.

В случае амперометрических электродов, например для определения спирта или глюкозы с использованием платинового или кислородного электрода,

можно применять полярограф, такой как Model 170 или Model 174 фирмы Princeton Applied Research. К электроду прикладывают потенциал $\pm 0,85$ В и регистрируют значение силы тока в микроамперах (мкА). После этого строят график зависимости силы тока (мкА) от концентрации (М) в линейных координатах.

Вместо полярографического оборудования при работе с амперометрическими электродами можно использовать адаптор для электродов (Universal Sensors, Inc., Нью-Орлеан, США). Этот адаптор представляет собой устройство, которое подает потенциал на амперометриче-

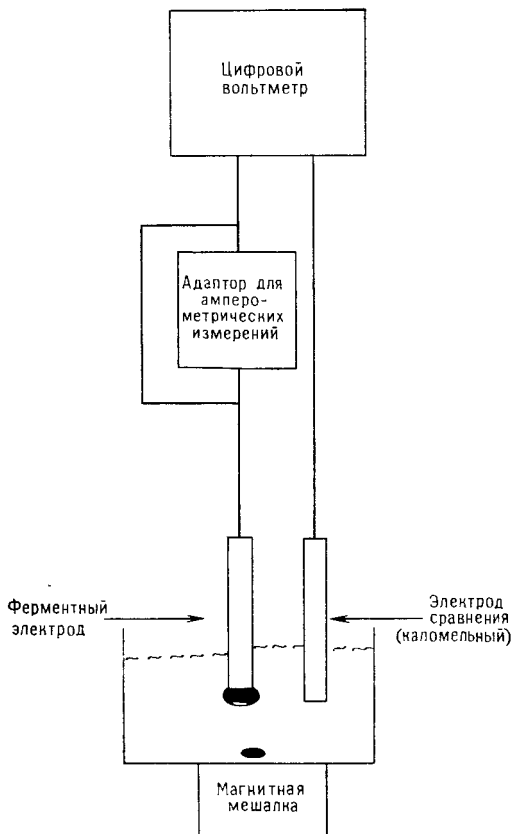


Рис. 5-3. Аппаратура для измерений с использованием ферментных электродов.

ский датчик для определения глюкозы или спирта и преобразует возникающий ток в разность потенциалов. Последнюю можно непосредственно измерить вольтметром, имеющим шкалу ± 1.7 В (например, вольтметром фирмы Orion, Corning и др.). Это позволяет работать с любыми ферментными электродами, имея лишь вольтметр и адаптор (цена адаптора ≈ 125 долл.).

Вместе с ферментным электродом используют электрод сравнения; обычно это каломельный электрод. Электрод сравнения может быть частью комбинированного ферментного электрода, как, например, в электродных датчиках NH_3 , CO_2 и O_2 фирмы Universal Sensors, на основе которых делают ферментные электроды для определения мочевины, аминокислот, глюкозы и спирта.

Наконец, следует обратить особое внимание на то, что скорость перемешивания раствора, в котором находится электрод, должна быть *постоянной*, поскольку, как было показано [8], изменение скорости перемешивания влечет за собой изменение регистрируемого потенциала. Влияние этого фактора обсуждалось в разд. 2.

3.2. Необходимые материалы

Для изготовления ферментного электрода (разд. 3.3) сначала выбирают подходящую ферментную систему, которую можно подыскать с помощью справочников по энзимологии, например Biochemists Handbook. В идеальном случае действие электрода должно основываться на первичной функции фермента, т. е. на основной реакции, которую он катализирует в природе. Например, в электроде для определения глюкозы следует использовать глюкозооксидазу, а в электроде для определения мочевины — уреазу. В некоторых случаях можно использовать фермент, для которого определяемое вещество служит вторичным субстратом, например алкогольдегидрогеназу в электроде для определения уксусной кислоты.

Следующим шагом является приобретение или получение фермента. Сделав выбор, нужно проверить, доступен ли фермент в виде коммерческого препарата и какова его чистота по каталогам фирм-поставщиков (Sigma, Boehringer, Worthington, Calbiochem, Miles и др.). Следует обратить особое внимание на характеристики чистоты фермента, приведенные в спецификации. Это существенно, чтобы избежать побочных реакций с участием других субстратов. В некоторых случаях можно воспользоваться и неочищенными препаратами ферментов, такими как уреазы из канавалии мечевидной и глюкозооксидаза, выпускаемыми фирмой General Mills для пищевой промышленности, непосредственно в псевдоиммобилизованном виде, например в виде жидкости, заключенной в диализную мембрану. Следует принять во внимание и активность фермента — для использования в электроде она должна составлять не менее 10 ед./мг белка.

Превосходные таблицы источников ферментов можно найти в работах [4] и [8].

Если необходимого фермента нет в продаже, то:

а) Следует послать запрос крупной биохимической фирме на выделение и очистку этого фермента. Многие фирмы могут это проделать за соответствующую плату. Например, фирма New England Enzyme Center of Tufts University (Бостон, США) специализируется на такого рода обслуживании клиентов.

б) Следует собрать сведения об этом ферменте, имеющиеся в опубликованных работах и справочниках по биохимии и энзимологии, выяснить, какие существуют методы его выделения и очистки, и провести выделение и очистку самостоятельно. В большинстве случаев эти методы достаточно просты для человека со средним опытом научной работы.

Следующим шагом является иммобилизация фермента с использованием одной из методик, описанных в разд. 3.3, и сборка

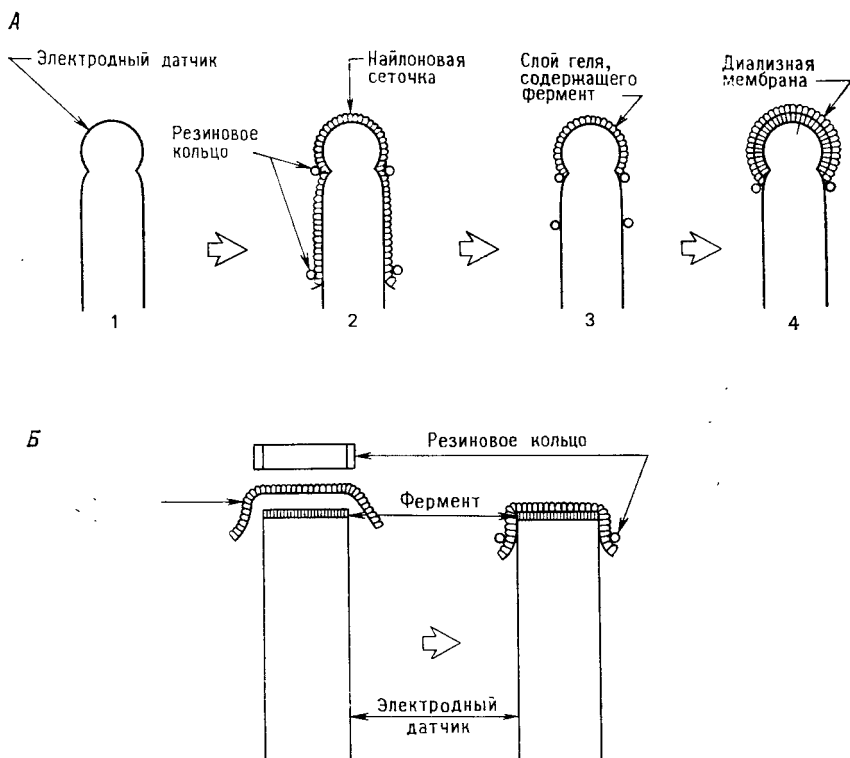


Рис. 5-4. Изготовление ферментных электродов. А. С использованием физически включенных ферментов. Б. С использованием химически связанных или растворимых ферментов.

Таблица 5-2. Электродные датчики, которые можно использовать в конструировании ферментных электродов

Датчик	Определяемое вещество
<i>А. Датчики для потенциометрических электродов</i>	
NH_3	Мочевина, аминокислоты, глутамин, глутаминовая кислота, нитрат, нитрит, креатинин, ферменты типа лиаз и дезаминаз
CO_2	Мочевина, аминокислоты, ферментативные системы декарбоксилирования
pH	Пенициллин, РНК, ДНК, глюкоза, ферментативные реакции, протекающие с изменением pH
I^- CN^-	Глюкоза, аминокислоты, холестерол, спирты Амигдалин
<i>Б. Датчики для вольтамперометрических (амперометрических) электродов</i>	
O_2	Глюкоза, аминокислоты, органические кислоты, спирты, мочевая кислота, холестерол, фосфат, все ферменты, катализирующие поглощение O_2
Pt или C	Все окислительно-восстановительные ферменты, сульфат, мочевая кислота, холестерол, спирты, глюкоза, аминокислоты, органические кислоты, системы с участием NADH/NADPH

электрода на основе выбранного ионселективного датчика (также см. разд. 3.3). Следует помнить: чем прочнее иммобилизован фермент, тем он стабильнее, тем дольше им можно пользоваться и тем больше измерений можно провести с одной партией фермента. Сначала можно использовать самый простой метод — удержание раствора фермента диализной мембраной. Затем можно применить физическое включение в гель или ковалентное присоединение. Мы рекомендуем использовать пришивку с помощью глутарового альдегида — это простой и быстрый метод, часто приводящий к желаемым результатам.

3.3. Изготовление электродов

3.3.1. Физически удерживаемые ферменты

Руководствуясь рис. 5-4, можно собрать электрод, пользуясь схемой А в случае фермента, физически включенного в гель, и схемой Б в случае ковалентно связанного или растворимого фермента.

Тип датчика, на основе которого готовят электрод, следует выбирать в соответствии с природой ферментативной реакции. Датчик должен реагировать на один из продуктов или субстратов ферментативной реакции. Примеры датчиков и типов ферментных электродов, которые могут быть созданы на их основе, приведены

Таблица 5-3. Получение ферментов, включенных в полость, ограниченную мембраной

Электрод с диализной мембраной

1. Повернуть электродный датчик, выбранный по табл. 5-1 или табл. 5-2, сенсорной частью вверх.
2. На поверхность датчика нанести 10—15 ед. растворимого фермента в виде густой пасты или лиофилизованного порошка. (*Примечание:* лучшие результаты получают с электродами, имеющими плоскую, а не круглую поверхность.)
3. Накрывать фермент кусочком диализной мембраны (целлофан толщиной 10—25 мкм, диализные мембраны фирм Will Scientific, Arthur H. Thomas, Sigma и др.), имеющим диаметр в два раза больший, чем диаметр электродного датчика.
4. Надеть на мембрану резиновое кольцо, плотно прилегающее к электроду (рис. 5-4, Б), и осторожно продвинуть его вдоль электрода, так чтобы образовался ровный однородный слой фермента.
5. Поместить электрод на ночь в буферный раствор, чтобы раствор фермента уравнился с буфером и захваченный воздух вышел за пределы мембраны.
6. Между экспериментами электрод хранить в холодильнике в буферном растворе, оптимальном для ферментной системы.

Электрод с физически иммобилизованным ферментом

1. Повернуть электродный датчик сенсорной частью вверх и накрыть поверхность электрода тонкой нейлоновой сеточкой толщиной ~50 мкм (выолне подойдет кусочек тонкого капронового чулка). Сеточку закрепить резиновым кольцом, как показано на рис. 5-4, А. Она будет удерживать раствор, из которого образуется гель, содержащий фермент.
2. Растворить 1,15 г N,N' -метиленбисакриламида (Eastman Chemical Co.) в 40 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 6,8, при 60 °C. Охладить до 35 °C, добавить 6,06 г акриламида (Eastman Chemical Co.) и отфильтровать этот раствор в колбу объемом 50 мл, содержащую 5,5 мг рибофлавина (Eastman Chemical Co.) и 5,5 мг персульфата калия. При хранении в темном месте этот раствор стабилен в течение нескольких месяцев.
3. Приготовить раствор для получения геля, содержащего фермент, смешиванием 100 мг фермента с 1,0 мл раствора мономеров (удельная активность фермента должна быть не ниже 10 ед./мг). Осторожно нанести этот раствор в виде тонкой пленки на нейлоновую сеточку, контролируя заполнение всех ячеек сеточки; 1 мл этого раствора хватает для приготовления многих электродов.
4. Поместить электрод в охлаждаемую камеру при 0,5 °C и удалить кислород, ингибирующий полимеризацию, продуванием азота. Не прекращая продувания азота, провести полимеризацию геля, освещая раствор в течение 1 ч лампой мощностью 150 Вт с рефлектором (можно использовать лампу фирмы Westinghouse). В результате должен образоваться сухой и прочный слой геля, содержащего фермент.
5. Для защиты ферментного слоя накрыть его диализной мембраной и закрепить мембрану еще одним резиновым кольцом.
6. Неиспользуемый электрод хранить в холодильнике.

в табл. 5-1 и 5-2. Методические подходы к изготовлению электродов с использованием ферментов, удерживаемых с помощью физических сил (нековалентно), описаны в табл. 5-3.

3.3.2. Ковалентно связанные ферменты

Сначала фермент иммобилизуют на нерастворимом носителе, а затем помещают на основной датчик (рис. 5-4, Б) и накрывают диализной мембраной. Можно воспользоваться одним из четырех методов, описанных в данном разделе. Методы с использованием глутарового альдегида и коллагеновой пленки очень просты в исполнении, и мы настоятельно рекомендуем ими пользоваться (табл. 5-4, 5-5). Если при этом происходит денатурация ферментов (например, если активность полученного ферментного электрода слишком низка), можно испробовать методики, описанные в табл. 5-6 и 5-7. Химические реакции, лежащие в основе методов, описанных в табл. 5-4—5-7, приведены на рис. 5-5—5-8.

Методика для изготовления электродов с коллагеновой пленкой (табл. 5-5) приведена в том виде, в котором она описана в работе [9], с использованием в качестве носителя для различных ферментов пленки из высокополимерного коллагена, полученной в промышленных условиях. Благодаря своей белковой природе коллаген имеет свободные аминокислотные группы, пригодные для ковалентного присоединения ферментов. Эти пленки имеют также высокое содержание многоатомных спиртов (33%), что делает их гидрофильными, придает им гибкость и механическую прочность.

Получение ковалентно связанной глюкозооксидазы с использованием ацилазидных производных полиакриламида или диазо-

Таблица 5-4. Получение ферментов, иммобилизованных с помощью глутарового альдегида

1. Перевернуть электродный датчик сенсорной частью вверх, как показано на рис. 5-4, Б.
2. Поместить на датчик мембрану (кусочек кишечной стенки свиньи) (Universal Sensors) и закрепить ее резиновым кольцом.
3. Нанести на мембрану 50 мкл смеси, состоящей из 2,7 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 6,8, 1,5 мл 17,5%-ного бычьего сывороточного альбумина (Sigma Chemical Co.) и 50 мг фермента (удельная активность не менее 10 ед./мг). Полностью смочить мембрану этой смесью.
4. Добавить 10 мкл 10%-ного глутарового альдегида, быстро распределяя его на поверхности мембраны стеклянной палочкой. Слой фермента должен сразу же затвердеть.
5. Инкубировать электрод в перевернутом состоянии в холодильнике в течение ночи для завершения формирования ферментного слоя. После этого накрыть ферментный слой диализной мембраной и хранить электрод в буферном растворе, в котором обычно работают с этой ферментной системой.

Таблица 5-5. Изготовление электродов с коллагеновой мембраной¹⁾

1. Приобрести коллагеновые мембраны у фирм Centre Technique du Cuir (Лион, Франция) или Rutgers University (Нью-Брансуик, США). Диаметр мембраны 2,5 см, толщина в сухом состоянии 0,1 мм, в набухшем — 0,3—0,5 мм.
2. Инкубировать мембраны в 60 мл 100%-ного метанола, содержащего 0,2 н. HCl, в течение 3 сут при комнатной температуре.
3. Тщательно промыть 5 мембран дистиллированной водой (остальные мембраны можно оставить для хранения в метанольном растворе).
4. Инкубировать мембраны в 100 мл 1%-ного гидразина в течение 12 ч при комнатной температуре.
5. Промыть мембраны дистиллированной водой и инкубировать их при 0°C (баня со льдом) в смеси, содержащей 0,5 М KNO₂ и 0,3 н. HCl, в течение 15 мин.
6. Промыть мембраны 0,05 М фосфатным буфером, pH 7,5, и инкубировать их при 4°C (в холодильнике) в течение ночи в 2 мл этого же буфера, содержащего не менее 50 ед. фермента.
7. Промыть мембраны буфером и хранить в нем до использования.

¹⁾ Для непосредственного использования коллагеновая мембрана, содержащая фермент, монтируется на соответствующем электродном датчике (например, на углекислотном или аммиачном газовом мембранном электроде или на платиновом электроде) и закрепляется резиновым кольцом. Электрод помещают в 2 мл раствора, содержащего определяемое вещество (например, глюкозу), и измеряют концентрацию субстрата по калибровочной кривой. После каждого измерения коллагеновую мембрану несколько раз промывают 0,05 М фосфатным буфером, pH 7,5.

Таблица 5-6. Получение глюкозооксидазы, ковалентно связанной с ацилазидным производным полиакриламида

Получение частиц полиакриламида

1. Растворить 21 г акриламида, 0,55 г N,N'-метиленабисакриламида, 13,6 г трис(оксиметил)аминометана (Sigma Chemical Co.), 0,086 мл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина (Eastman Chemical Co.) и 18 мл 1 н. HCl в 300 мл дистиллированной воды.
2. Добавить в качестве катализатора персульфат аммония. Провести свободнорадикальную полимеризацию, перемешивая смесь магнитной мешалкой в атмосфере азота и освещая ее лампой мощностью 150 Вт с рефлектором (Westinghouse).
3. После завершения полимеризации извлечь из полиакриламида магнитную мешалку и разделить его на крупные куски. Получить мелкие сферические частицы полимера разрушением его в гомогенизаторе при высокой скорости вращения ножей в 300 мл воды в течение 5 мин. Полученную суспензию частиц хранить в холодильнике.

Получение гидразидного производного

1. Внести 300 мл суспензии частиц полиакриламида в силиконизированную трехгорлую круглодонную колбу.
2. Поместить колбу и стаканчик с 30 мл безводного гидразина (Matheson, Coleman and Bell) в термостатируемую масляную баню с температурой 50°C.
3. После инкубации в течение 45 мин добавить гидразин к суспензии геля. Закрыть колбу пробками и перемешивать смесь магнитной мешалкой в течение 12 ч при 50°C.
4. Отцентрифугировать смесь и удалить супернатант. Промыть гель 0,1 М NaCl, перемешивая его магнитной мешалкой в течение нескольких минут, отцентрифугировать и удалить супернатант.

5. Повторять процедуру промывки геля до тех пор, пока супернатант не будет содержать гидразина. Признаком отсутствия гидразина является бледно-фиолетовое окрашивание, развивающееся через 5 мин после смешивания 5 мл супернатанта с несколькими каплями 3%-ной 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты (Eastman Chemical Co.) и 1 мл насыщенного тетрабората натрия (Mallinkrodt). Хранить гидразидное производное геля в холодильнике.

Присоединение глюкозооксидазы

1. Поместить 100 мг гидразидного производного в пластиковую центрифужную пробирку и промыть 0,3 н. HCl.
2. Суспендировать гель в 15 мл 0,3 н. HCl, охладить до 0 °C и добавить 1 мл 1 М нитрита натрия, также охлажденного до 0 °C.
3. Перемешать смесь магнитной мешалкой в бане со льдом в течение 2 мин и быстро промыть образовавшееся азидное производное 0,1 М фосфатным буфером, pH 6,8. Отцентрифугировать смесь и декантировать супернатант. Последнюю операцию повторять до тех пор, пока значение pH супернатанта не станет близким к 6,8.
4. Суспендировать азидное производное геля в 10 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 6,8, содержащего 100 мг глюкозооксидазы (Sigma Chemical Co., Type II, из *Aspergillus niger*).
5. Перемешивать смесь магнитной мешалкой в течение 60 мин при 0 °C, после чего добавить 10 мл 0,5 М глицина для блокирования непрореагировавших азидных групп.
6. Перемешивать смесь еще 60 мин при 0 °C, несколько раз промыть гель, содержащий фермент, 0,1 М фосфатным буфером, pH 6,8, и хранить в холодильнике.

производных полиакриловой кислоты описано в табл. 5-6 и 5-7 соответственно.

3.4. Как пользоваться ферментным электродом

Когда электродом не пользуются, его хранят в холодильнике в буферном растворе, природа которого, pH и оптимальная концентрация определяются свойствами используемой ферментной системы.

Электродом, изготовленным с помощью растворимого фермента, можно провести около 50 измерений в течение более чем 7 сут; с помощью фермента, включенного в гель, — 100—200 измерений в течение 14—21 сут; с помощью химически иммобилизованного фермента — 200—1000 измерений в течение 6—14 мес. Диализная мембрана на электроде выполняет две функции: а) удерживает фермент на электроде; б) защищает слой фермента от бактерий.

Для проведения измерений электрод подключают к цифровому вольтметру. При использовании амперометрического датчика, например для определения глюкозы, подключение осуществляют с помощью адаптора фирмы Universal Sensors (рис. 5-3). Если ферментный датчик не имеет встроенного электрода сравнения, то к вольтметру следует подключить еще и каломельный электрод.

Таблица 5-7. Получение глюкозооксидазы, ковалентно связанной с диазопроизводным полиакриловой кислоты

Полимеризация акриловой кислоты

1. Растворить примерно 50 мл акриловой кислоты (Aldrich Chemical Co., reagent-grade) в 20 мл гексана и поместить раствор в круглодонную колбу.
2. Добавить несколько миллиграммов персульфата аммония в качестве инициатора свободнорадикальной полимеризации и инкубировать смесь в атмосфере сухого азота.
3. Нагревать колбу до тех пор, пока не станет заметна быстрая полимеризация. Немедленно убрать нагреватель и дать возможность колбе охладиться до комнатной температуры.

Получение сополимера

1. Разделить полимер на мелкие частицы и нейтрализовать кислоту гидроксидом натрия.
2. Высушить натриевую соль кислоты упариванием в вакуумном ротормном испарителе и растереть полимер до состояния мелкого порошка.
3. Суспендировать около 3,6 г порошка в 6 мл гексана и охладить примерно до 4°C.
4. Превратить кислоту в ацилхлорид добавлением 2,8 мл SOCl_2 и перемешиванием в бане со льдом в течение 1 ч (образующиеся газы удалять отсасыванием).
5. Промыть полимерный акрилоилхлорид эфиром и высушить его в вакууме.
6. Добавить 0,5 г нитроанилина и 6 мл эфира и перемешивать смесь в течение ночи.
7. Отфильтровать полученный продукт, промыть его эфиром и высушить на воздухе.

Присоединение глюкозооксидазы

1. Растворить 150 мг *n*-нитроанилидного производного в 10 мл дистиллированной воды и довести pH раствора до 5 разбавленной уксусной кислотой.
2. Медленно с перемешиванием добавить этилендиамин до образования мелкого белого осадка.
3. Три раза промыть осадок дистиллированной водой и суспендировать его в 5 мл дистиллированной воды.
4. Восстановить полимер добавлением TiCl_3 и несколько раз промыть дистиллированной водой с помощью центрифугирования и декантации супернатанта.
5. Превратить восстановленное производное в соль диазония добавлением 10 мл 0,5 М азотистой кислоты и перемешиванием при 4°C в течение 2 мин.
6. Промыть соль диазония холодной дистиллированной водой и затем быстро 0,1 М фосфатным буфером, pH 6,8, центрифугируя смесь и декантируя супернатант.
7. Перемешивать полимер в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,8, содержащем 100 мг глюкозооксидазы (Sigma Chemical Co., Type II) при 4°C в течение 1 ч.
8. Несколько раз промыть гель буфером и хранить его в холодильнике.

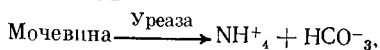
Готовят два стандартных раствора определяемого вещества с концентрациями 10^{-2} и 10^{-4} М в используемом буфере. Сначала ферментный электрод и электрод сравнения помещают в буфер для измерения фонового потенциала, а затем переносят электроды в стандартные растворы и регистрируют значения потенциала. Калибровочную кривую строят в форме зависимости потенциала от логарифма концентрации определяемого вещества. После этого электроды помещают в раствор с неизвестной концентрацией и регистрируют потенциал. Концентрацию вещества рассчитывают по калибровочной кривой. Если отклик электрода ухудшается (разд. 4), то старую ферментную мембрану заменяют новой.

4. Примеры ферментных электродов

4.1. Широко используемые ферментные электроды

В табл. 5-1 перечислен ряд ферментных электродов, предназначенных для определения часто встречающихся субстратов. Для каждого электрода приведен используемый фермент, датчик, метод иммобилизации, стабильность, время отклика, количество единиц активности фермента, использованное для изготовления электрода, и диапазон измеряемых концентраций. Более полный список электродов можно найти в работе [4].

Иногда для одного и того же субстрата используют различные основные датчики. Например, для определения мочевины можно использовать либо катионселективный электрод, измеряющий концентрацию ионов NH_4^+ , которые образуются при гидролизе мочевины, катализируемом уреазой:



либо датчик рН, измеряющий изменение рН, связанное с образованием продуктов этой реакции, либо газомембранный аммиачный или углекислотный электрод, измеряющий концентрацию газообразных NH_3 (образующегося в результате вторичной реакции $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$) или CO_2 (образующегося по реакции $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$). Наилучшим датчиком является аммиачный электрод, для которого характерна высокая специфичность и низкий порог чувствительности (10^{-6} М по сравнению с $5 \cdot 10^{-5}$ М для углекислотного электрода). Недостатком этого электрода является медленность отклика (2—4 мин) и возврата в исходное состояние (15—10 мин). Одним электродом с уреазой, которая присоединена химически к полипропиленовой мембране, являющейся частью аммиачного газомембранного электрода, было проведено 200—1000 измерений с коэффициентом вариации 2,5% в диапазоне концентраций мочевины $5 \cdot 10^{-5}$ — 10^{-2} М [10]. При этом выполняли по крайней мере 20 измерений в час с очень хорошим

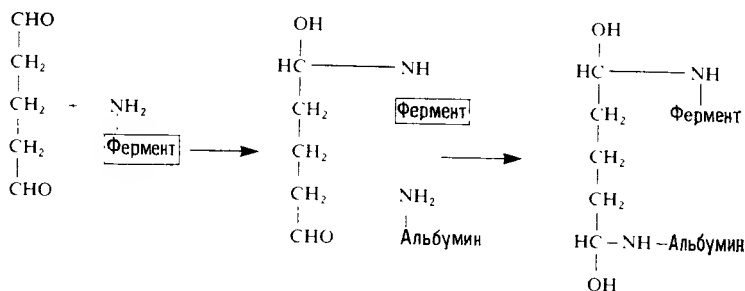
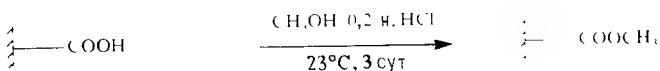


Рис. 5-5. Реакции, протекающие при получении ферментов, иммобилизованных с использованием глutarового альдегида.

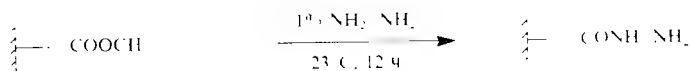
совпадением полученных данных с результатами спектрофотометрического определения двадцетильным методом.

Рабочий диапазон определяемых концентраций для большинства ферментных электродов составляет 10^{-2} — 10^{-4} М. Для некоторых из них верхний предел может быть 10^{-1} М (в зависимости от растворимости субстрата в водных растворах), а нижний может доходить до 10^{-5} М или еще ниже в зависимости от порога чувствительности датчика.

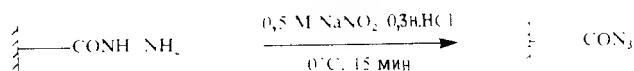
Часть 1. Активация: образование ацилазида



Промывка бидистиллированной водой, 23°C



Промывка бидистиллированной водой, 0°C



Промывка 0,05 М фосфатным буфером, $\text{pH } 7,5$

Часть 2. Присоединение фермента

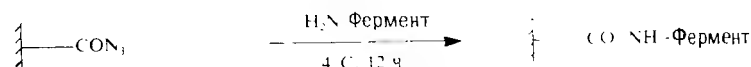


Рис. 5-6. Реакции, протекающие при изготовлении электродов с коллагеновыми мембранами.

Ухудшение работы ферментного электрода может проявиться в следующем:

а) в снижении со временем верхнего предела рабочих концентраций, например, с 10^{-1} М до 10^{-2} М;

б) в уменьшении наклона калибровочной кривой (т. е. кривой зависимости потенциала от логарифма концентрации) с 60 мВ, по Нернсту, до 50, 40, возможно даже 30 мВ и ниже;

в) в увеличении времени отклика электрода, исходное значение которого составляет 0,5—4 мин (что примерно соответствует времени отклика основного датчика).

При изготовлении ферментного электрода очень важна высокая чистота препаратов (активность не менее 10 ед./мг), позволяющая использовать фермент в небольших количествах. Это обеспечивает быстроту отклика электрода, близкую к скорости отклика основного датчика. Из данных табл. 5-1 видно, что обычно используют по крайней мере 10 ед. фермента (1 мг).

Стабильность электрода зависит от способа иммобилизации фермента. Наиболее стабильны электроды с химически иммобилизованными ферментами. С помощью этих электродов можно прово-

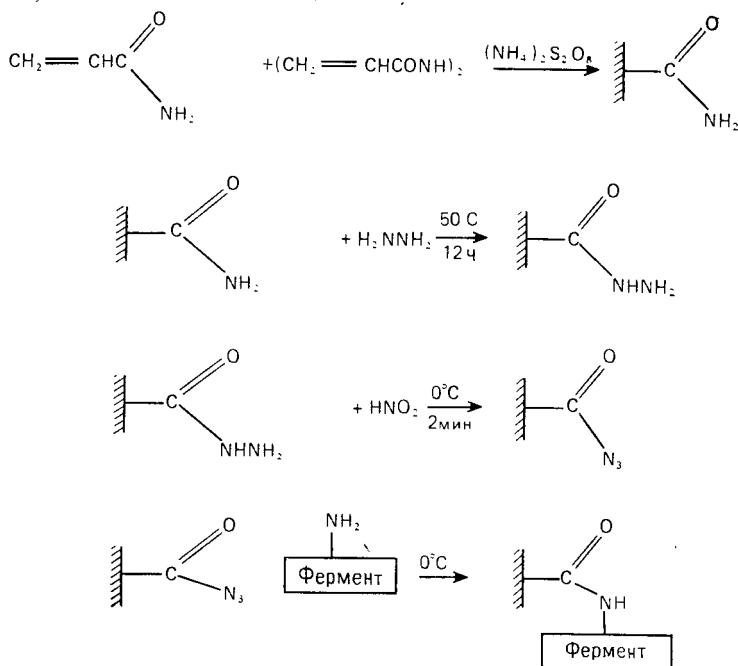


Рис. 5-7. Реакции, протекающие при получении ферментов, ковалентно связанных с ацилазидным производным полиакриламида.

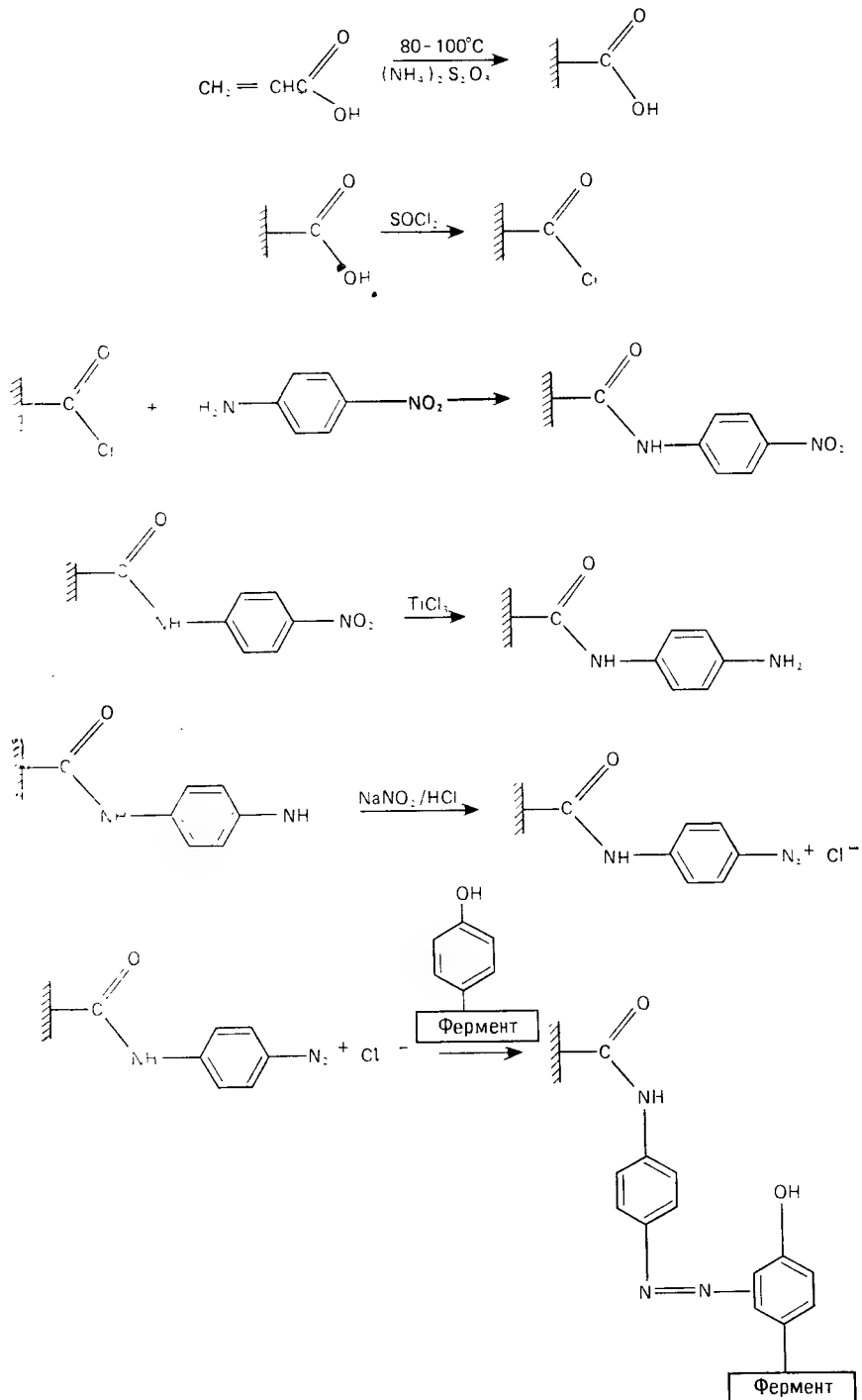
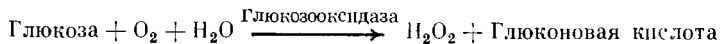


Рис. 5-8. Реакции, протекающие при получении ферментов, ковалентно связанных с диазопроизводным полиакриловой кислоты.

дить по 500—1000 измерений, и их можно хранить в течение 6—14 мес.

В первом ферментном электроде — датчике амперометрического типа — была использована растворимая глюкозооксидаза, заключенная между мембранами с коммерческим названием Cigrorhan [1]. Поглощение кислорода измеряли с помощью кислородного электрода



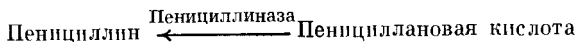
Из всех основных датчиков, применяемых для регистрации этой реакции (см. табл. 5-1: рН-электрод, платиновый электрод для определения H_2O_2 , платинохлоргидродный, I-селективный и газовый кислородный), лучшим является кислородный электрод. Специфичность определения резко увеличивается, если регистрировать лишь начальную скорость поглощения O_2 ; большинство помех возникают из-за взаимодействия образующейся H_2O_2 с различными веществами, такими как аскорбиновая кислота и другие витамины.

В первом ферментном электроде для определения L-аминокислот слой иммобилизованной оксидазы L-аминокислот был нанесен на электрод, селективный по отношению к одновалентным катионам, который регистрировал образование ионов аммония при каталитическом окислении аминокислот. Оксидаза L-аминокислот из змеиного яда обладает широкой специфичностью, что позволяет определять L-цистеин, L-лейцин, L-тирозин, L-триптофан, L-фенилаланин и L-метионин.

Две аминокислоты, L-лизин и L-метионин, заслуживают особого внимания с точки зрения их роли в питании. Точное измерение содержания этих аминокислот в пищевых продуктах позволяет установить их белковую ценность. Это исключительно важно для оценки питательных свойств пищи. Однако чтобы это сделать, необходимо отделить эти аминокислоты от других с помощью аминокислотного анализатора и определить их содержание нингидрином. Благодаря высокой специфичности ферментов можно сконструировать специфичные и высокочувствительные электроды для определения L-лизина и L-метионина с использованием L-лизин-декарбоксилазы из *Escherichia coli* на углекислотном датчике и L-метионин — аммиак-лиазы на аммонийчувствительном электроде соответственно [4]. При этом можно работать в диапазоне концентраций 10^{-2} — 10^{-5} М практически без помех. Таким образом, предварительного разделения аминокислот уже не требуется.

Еще одним важным электродом, описанным в литературе, является пенициллиновый электрод, который в настоящее время широко применяется для контроля за содержанием пенициллина в ростовых средах. Действие этого электрода основано на использовании рН-датчика, покрытого иммобилизованной пенициллина-

зои.



Отклик электрода очень быстрый (менее 30 с), наклон кривой зависимости потенциала от логарифма концентрации пенициллина составляет 52 мВ в диапазоне концентраций $5 \cdot 10^{-2} - 10^{-4}$ М [4].

4.2. Электродные датчики с использованием ферментов в целых клетках микроорганизмов и тканей

Новым словом в разработке биологических электродных датчиков является создание биоселективных датчиков путем нанесения целых клеток микроорганизмов или тканей на поверхность ионселективных электродов. Впервые датчик такого типа описал Дивис [12, 13], который отмечает следующие их достоинства.

а) Нет необходимости получать очищенные ферменты — можно непосредственно использовать целые клетки или срезы тканей без выделения и очистки белков.

б) Электрод можно регенерировать погружением в питательную среду. Микроорганизмы сохраняют жизнеспособность довольно долго.

в) Целые клетки могут содержать несколько кофакторов и ферментов, катализирующих реакции, которые трудно, если вообще возможно, осуществить с помощью одного иммобилизованного фермента. Кроме того, кофакторы, необходимые для ферментативных реакций, находятся в естественно иммобилизованном состоянии.

Однако у таких электродов есть и недостатки:

а) Низкая селективность, обусловленная присутствием в клетке микроорганизма ряда ферментов, которые могут катализировать побочные реакции.

б) Часто наблюдается медленный отклик электрода, поскольку концентрации ферментов в клетках низки, а мембрана электрода довольно толстая и поэтому может замедлять диффузионные процессы.

В качестве примеров можно привести использование клеток *Neurospora europa* для определения аммиака, *Trichosporon brassicae* для определения уксусной кислоты, *Sarcina flava* (глутаминаза) для определения глутамина, *Azotobacter vinelandii* (нитратредуктаза) для определения нитрат-ионов и срезов почек свиньи (глутаминаза) для определения глутамина [4].

Эти электроды можно изготовить, как описано в разд. 3.3. В качестве метода иммобилизации предпочтительно использовать физическое включение (разд. 3.3.1) или химическое присоединение с помощью глутарового альдегида (разд. 3.3.2).

4.3. Датчики, основанные на взаимодействии антиген—антитело

Одним из возможных применений биологических датчиков является создание сенсоров на основе иммобилизованных антигенов или антител. Так, например, мы использовали антитела к изоферменту М креатинкиназы (КК-М) для определения изофермента МВ — специфического фермента сердечной мышцы (КК-МВ). Козьи антитела класса IgG против КК-М человека иммобилизовали на носителе (сферические частицы из стекла) с помощью глутарового альдегида и носитель помещали в трубочку. Этот датчик можно использовать для нескольких сот измерений, а затем регенерировать. С использованием такого электродного датчика были получены очень хорошие результаты по определению КК-МВ [4].

Альтернативный подход, в котором был использован иммобилизованный антиген, описал Сузуки [14], который разработал метод диагностики сифилиса, основанный на обнаружении антител в крови. В этой системе измеряли контактный потенциал и регистрировали его незначительные (1—3 мВ) изменения.

4.4. Наличие датчиков в продаже

Иммобилизованные ферменты наряду с электрохимическими датчиками используются в некоторых приборах, выпускаемых для продажи. Фирма Owens-Illinois (Kimble) создала прибор для определения мочевины с использованием иммобилизованной уреазы на аммиачного электрода, а также прибор для определения глюкозы с использованием иммобилизованной глюкозооксидазы на платинового электрода. Фирма Technicon приобрела патент на эту систему и продает ее в Европе.

Фирма Yellowsprings Instrument Co. (США) продает прибор для определения глюкозы, в котором подушечка с иммобилизованной глюкозооксидазой размещена на платиновом электроде. Фирма также располагает приборами для определения триглицеридов, липазы, холестерина и амплазы. Фирмой Fuji Electric (Токио, Япония) разработан прибор для определения глюкозы, аналогичный по конструкции прибору фирмы Yellowsprings Instrument Co.

Собственно электроды, не входящие в состав приборов, продают лишь две фирмы: фирма Tacussel (Лион, Франция) продает электроды для определения глюкозы, в которых глюкозооксидаза иммобилизована на коллагене по методу Куле и др. [9]; фирма Universal Sensors (Нью-Орлеан, США) предлагает датчики для определения мочевины, глюкозы, креатинина, аминокислот, спиртов и других веществ по специальному запросу. В этих электродах ферменты иммобилизованы на кусочке кишечной стенки свиньи.

Примечание. Ж. Ж. Гильбо — сотрудник отделения химии университета в Нью-Орлеане (США) — проводил исследования на средства фонда Фулбрайта.

Литература

1. *Clark L., Lyons C.* Ann. N. Y. Acad. Sci., **102**, 29 (1962).
2. *Updike S. J., Hicks G. P.* Nature, **214**, 986 (1971).
3. *Guilbault G., Montalvo J. J.* Am. Chem. Soc., **91**, 2164 (1969).
4. *Guilbault G.* In: Handbook of Immobilized Enzymes, Marcel Dekker, New York, 1984.
5. *Guilbault G. G., Lubrano G.* Anal. Chim. Acta, **64**, 439 (1973).
6. *Mascini M., Liberti A.* Anal. Chim. Acta, **68**, 117 (1974).
7. *Anfalt T., Granelli A., Jagner D.* Anal. Lett., **6**, 969 (1973).
8. *Guilbault G. G.* In: Handbook of Enzymatic Analysis, Marcel Dekker, New York, 1974.
9. *Coulet P. R., Thevenot D. R., Standberg R., Laurent J., Gautharon D.* Anal. Chem., **51**, 96 (1979).
10. *Guilbault G., Mascini M.* Anal. Chem., **49**, 795 (1977).
11. *Guilbault G., Hrabankova E.* Anal. Lett., **3**, 53 (1970).
12. *Divies C.* Ann. Microbiol. (Paris), **126A**, 175 (1975).
13. *Divies C.* Chem. Eng. News, **54**, 23 (1976).
14. *Suzuki S. J.* Solid Phase Biochem., **4**, 25 (1979).

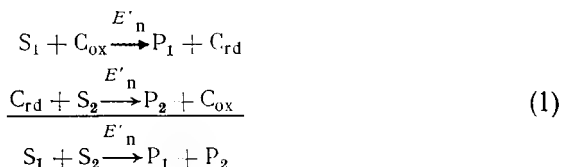
ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ

Лемюзль Б. Уингард, мл.

1. Введение

В окислительно-восстановительных реакциях происходит перенос электронов между субстратами и продуктами. Эти реакции представляют собой один из основных типов реакций, в которых утилизируется или переносится значительное количество энергии. Биологические окислительно-восстановительные реакции, катализируемые ферментами из класса оксидоредуктаз, особенно интересны тем, что в отличие от некатализируемых подобных реакций они протекают в сравнительно мягких условиях и без образования побочных продуктов. Крупномасштабное использование окисления — восстановления в химической промышленности, а также в разработке химических методов клинического анализа породило большой интерес к использованию оксидоредуктаз в этих двух областях. Изучение механизмов действия оксидоредуктаз продолжает оставаться одним из основных разделов биохимических исследований. Ферменты окисления — восстановления в настоящее время представляют интерес как с точки зрения фундаментальных биохимических исследований, так и с точки зрения практического использования в промышленности и аналитической химии.

Поскольку при окислительно-восстановительных реакциях происходит перенос электронов, для установления типа и глубины протекания реакции, а также для идентификации продуктов и выяснения механизмов реакции можно использовать электрохимические методы. В случае оксидоредуктаз кофакторная часть (С. от англ. cofactor) голофермента подвергается окислению или восстановлению, и ее состояние, наряду с субстратами (S. от англ. substrate) и продуктами (P. от англ. product), может быть зарегистрировано электрохимическими методами. Схематически это показано в уравнении (1), где E'_n — апофермент (голофермент E_n без кофактора), а C_{ox} и C_{rd} — окисленная и восстановленная формы кофактора соответственно.



Как видно из уравнения (1), E'_n катализирует реакции образования P_1 и P_2 . Однако в ряде случаев фермент E'_n катализирует образование только P_1 . В общем случае образование P_2 с параллельной регенерацией S_{ox} катализируется либо E'_n , либо другим ферментом, либо реагентом неферментативной природы. С помощью электрохимических методов возможна регистрация состояния голофермента, кофакторов, субстрата или продуктов. Если реакция, катализируемая ферментом, протекает в гомогенном растворе, то все участники реакции, по крайней мере в начальный момент времени, имеют одинаковый доступ к поверхности электрода. При иммобилизации одного из реагентов на поверхности электрода появляются новые возможности. Поскольку эта книга в основном посвящена иммобилизованным веществам и клеткам, дальнейшее изложение материала будет ограничено описанием методологических подходов, в которых либо голофермент, либо кофактор иммобилизованы на поверхности электрода. Вместе с тем для интерпретации результатов будет полезным сравнение со свойствами этих же реагентов в растворе.

Имеется обширный набор электрохимических методов, которые можно использовать для изучения систем с иммобилизованными оксидоредуктазами. Если электрод с иммобилизованным ферментом поместить в раствор субстрата с добавленным туда для обеспечения низкого сопротивления раствора электролитом, то возникают две принципиальные возможности. С одной стороны, можно поддерживать ток на постоянном уровне и регистрировать зависимость потенциала (хронопотенциометрия) или количество электричества (хронокулонометрия) от времени. С другой стороны, можно поддерживать постоянным потенциал и регистрировать зависимость силы тока (хроноамперометрия) или интеграла тока (хронокулонометрия) от времени либо изучать зависимость силы тока от величины приложенного потенциала (вольтамперометрия). Кроме того, электрод может быть подвижным или стационарным, раствор может быть неподвижным (неперемешиваемым) или перемешиваемым. Понятно, что все эти методы нельзя описать в одной главе. Поэтому мы решили ограничиться двумя типами вольтамперометрии, а именно, циклической и дифференциальной импульсной вольтамперометрией. Именно эти методы особенно полезны для изучения механизмов реакций и для идентификации продуктов в системах с иммобилизованным ферментом или кофактором. Практические и математические аспекты других электрохимических методов читатель может найти в работах [1] и [2] соответственно.

Иммобилизация на поверхности электрода системы фермент — кофактор придает ей ряд новых по сравнению с системой в водном растворе свойств, которые можно изучать методом вольтамперометрии или другими электрохимическими методами. К числу таких свойств относится возможность контролировать пространствен-

ное распределение апофермента и кофактора, используя разные методы иммобилизации этих компонентов, например разные точки пришивки в молекулах фермента и кофактора и разные типы связи с носителем [3, 4]. Кроме того, при переносе субстратов или продуктов через носитель с иммобилизованным ферментом и кофактором могут возникать значительные диффузионные сопротивления. В случае электроактивных субстратов или продуктов эти сопротивления можно определить электрохимическими методами [5].

2. Иммобилизация окислительно-восстановительных групп на поверхности электродов

2.1. Описание и подготовка носителей

Поскольку носитель для иммобилизации служит поверхностью электрода, он должен быть более или менее хорошим проводником электричества. При изготовлении химически модифицированных электродов [6] широко используются платина, стекловидный углерод, различные формы графита, оксид олова и различные полимеры пиридинового типа; они являются подходящими носителями для иммобилизации окислительно-восстановительных ферментов и кофакторов. Поверхность металлического электрода, такого, например, как платиновый, должна быть покрыта пленкой оксида. С алкилсиланом связывается практически любой оксид металла. Выбрав подходящую функциональную группу на конце алкильной цепи, для закрепления на электроде можно использовать различные связи между алкилсиланом и ферментом или кофактором. Так, например, для присоединения различных веществ к оксидам платины, олова и др. часто используют γ -аминопропилтриэтоксисилан [6, 7].

Стекловидный углерод — газонепроницаемая форма твердого углерода — обладает очень малой пористостью и высокой прочностью. Это очень хороший материал для электродов, поскольку его можно полировать и получать электрохимически воспроизводимые поверхности [8]. Большинство углеродных поверхностей содержит небольшое количество различных функциональных групп, в состав которых входит кислород. В случае стекловидного углерода количество таких групп обычно невелико, поэтому необходимо каким-то образом активировать поверхность. В качестве наиболее подходящего метода активации обычно используют окисление поверхности стекловидного углерода с образованием карбоновых кислот; в действительности, по-видимому, происходит образование и других функциональных групп [6]. Активацию поверхности можно проводить электрохимически [9], радиочастотным излучением в присутствии кислорода [10] или обработкой горячей кислотой [11]. При этом данные о степени активации поверхности, приве-

денные разными группами исследователей, слегка варьируют. Подробно эти методы описаны в разд. 2.2. Максимального уровня иммобилизации мы достигали, используя в качестве метода активации обработку горячей кислотой [12].

Для изготовления электродов используют различные формы графита. Графиты, как правило, значительно более пористы, чем стекловидный углерод, и из них труднее приготовить электрохимически идентичные поверхности. Кроме того, высокая степень пористости обуславливает большую площадь поверхности пор. Поэтому на поверхности графита органические соединения адсорбируются значительно сильнее, чем на стекловидном углероде. Действительно, кофакторы можно иммобилизовать на графитовых электродах адсорбцией [13].

На выбор электродного материала влияет также рабочий диапазон прилагаемых к нему потенциалов. Например, выделение водорода, взаимодействие электролита и компонентов буферного раствора с электродом могут являться причиной возникновения повышенных фоновых токов, которые ограничивают приемлемый диапазон потенциалов для электродов многих типов. Рабочий диапазон для платины в сильноокислом растворе составляет примерно от -200 мВ до $+1100$ мВ; при pH 7 — от -600 мВ до $+600$ мВ [14]. Для различных форм углерода рабочий диапазон простирается от -1100 мВ до $+1100$ мВ [14].

2.2. Конкретные методики иммобилизации

Этот раздел содержит подробное описание нескольких методик иммобилизации кофакторов или ферментов на поверхности элект-

Таблица 6-1. Иммобилизация кофакторов или ферментов на графите

1. Отшлифовать торцы графитовых стержней ¹⁾ наждачной бумагой с зернами карбида кремния, а затем тканью, пропитанной алмазным порошком с диаметром частиц 1 мкм.
2. Для удаления адсорбированных веществ провести экстракцию стержней этанолом или метанолом в аппарате Сокслета в течение ночи и затем высушить стержни в вакуумном шкафу в течение нескольких часов при комнатной температуре.
3. Погрузить очищенный отшлифованный торец графитового электрода в 1 мМ водный раствор кофактора или раствора фермента (1—20 мг/мл) на 12—24 ч. Адсорбцию проводить при комнатной температуре. Если фермент обладает низкой стабильностью, использовать температуру 4 °C.
4. Промыть электрод с иммобилизованным ферментом или кофактором растворами разной ионной силы, pH и состава для удаления слабо связанных веществ в отсутствие денатурации фермента.

¹⁾ Цилиндрические стержни спектроскопически чистого графита (Type 3751 SPK) диаметром около 0,46 см и длиной 3 см можно приобрести у фирмы Carbon Products Division of Union Carbide Corp. Графит имеет плотность 1,90 г/см³, степень его пористости 16,5%, средний диаметр пор 0,3 мкм [13].

Таблица 6-2. Иммобилизация кофакторов или ферментов на стекловидном углероде

1. Разрезать стержни стекловидного графита алмазной пилой на куски длиной 2—3 см. Отшлифовать торцы, очистить и высушить аналогично тому, как описано в табл. 6-1.
2. Окислить отшлифованные торцы одним из следующих способов:
 - а) обработать в течение 10 мин полем радиочастотного излучателя фирмы Harrick Scientific Corp. при давлении кислорода 150 мторр;
 - б) обработать 70%-ной азотной кислотой в течение 15 мин и затем 95%-ной серной кислотой в течение 60 мин при 170°C;
 - в) обработать 10%-ной азотной кислотой в течение 3 мин; при этом к электроду должен быть приложен потенциал +2,2 В относительно Ag/AgCl-электрода в 1 М KCl.
3. Промыть окисленный стекловидный углерод водой и активировать карбоксильные группы его поверхности раствором гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (5 мг/мл) в течение 1,5 ч при комнатной температуре.
4. Промыть активированные стержни водой и инкубировать их в растворе фермента или кофактора с последующей промывкой для удаления не связавшихся веществ [12].

родов. В нем даны лишь несколько примеров; разумеется, для описания всех опубликованных методов потребовалось бы много таких глав, как эта.

Кофакторы, например флавинадениндинуклеотид (FAD) или никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+), или ферменты, например глюкозооксидазу, можно иммобилизовать на спектроскопически чистом графите адсорбцией, как описано в табл. 6-1.

В случае ковалентного присоединения к стекловидному углероду (табл. 6-2) предпочтительно использовать углерод Tokai Type GC-A, производимый фирмой International Minerals and Chemical

Таблица 6-3. Иммобилизация кофакторов или ферментов на платине

1. Провести мягкое химическое окисление платинового электрода в 15%-ной азотной кислоте в течение ночи при комнатной температуре. Для получения более плотного оксидного слоя на поверхности платины электрохимическим способом поместить электрод в 0,5 н. серную кислоту, провести два цикла развертки приложенного к нему потенциала от +1,90 В до -0,45 В (относительно стандартного каломельного электрода) со скоростью развертки 50 мВ/с и затем приложить потенциал +1,90 В еще на 5 мин.
2. Как в том, так и в другом случае перед присоединением алкильного удлинительного электрода промыть и высушить.
3. Инкубировать электрод в 10%-ном свежеперегнанном γ -аминопропилтриэтоксисилане в безводном толуоле в течение 1 ч [15].
4. Соединить аминогруппы силана с аминогруппами фермента или кофактора, используя, например, 2,5%-ный глутаровый альдегид в 0,05 М фосфатном буфере, pH 6,0 (время обработки 1 ч при 0°C), или какой-либо другой бифункциональный реагент.

Согр. (Нью-Йорк), однако этот материал дорог. Он имеет плотность $1,50 \text{ г/см}^3$ и степень пористости $1-2\%$.

Типичная методика активации поверхности оксида металла включает в себя очистку поверхности экстракцией метанолом в аппарате Сокслета в течение ночи с последующим высушиванием в вакууме. Другой метод очистки, которым также можно удалить ранее присоединенные силаны, заключается в кипячении платины в 1 н. гидроксиде натрия в течение 30 мин с последующим интенсивным промыванием водой и разбавленной азотной кислотой. Пленку оксида, к которому присоединяют кофакторы и ферменты, можно получить на поверхности платины химически или электрохимически (табл. 6-3).

Типичные значения количества веществ, иммобилизованных описанными выше методами, составляют $10^{-9}-10^{-11} \text{ моль/см}^2$. Значение $10^{-10} \text{ моль/см}^2$ характерно для иммобилизации в форме монослоя [6]. Методологические основы определения этих значений с помощью вольтамперометрических измерений описаны в разд. 3.3.

3. Циклическая вольтамперометрия с использованием иммобилизованных веществ

3.1. Описание циклической вольтамперометрии

Вольтамперометрия — это измерение силы тока, возникающего при наложении на электрод потенциала. Потенциал можно варьировать, например линейно увеличивать во времени. Полученную зависимость силы тока от потенциала можно рассматривать как эквивалент спектра поглощения, где характеристическими параметрами служат амплитуда, форма и относительное расположение пиков тока. В циклической вольтамперометрии потенциал варьируют с определенной скоростью сначала в одном направлении, а

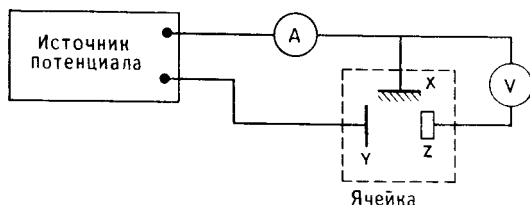


Рис. 6-1. Схема установки для циклической вольтамперометрии. X — электрод с иммобилизованным ферментом или кофактором (рабочий электрод), Y — вспомогательный электрод и Z — электрод сравнения, относительно которого измеряется приложенный потенциал. A — прибор, измеряющий ток, V — прибор, измеряющий приложенный потенциал.

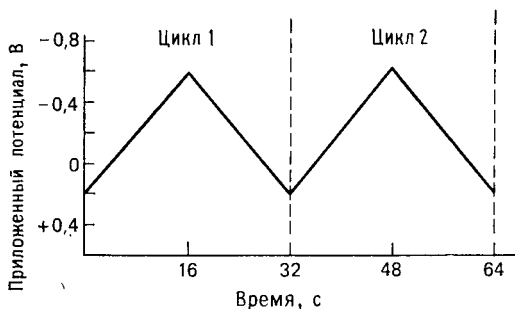


Рис. 6-2. Типичная для циклической вольтамперометрии зависимость приложенного потенциала от времени. Развертку потенциала ведут между значениями $+0,2$ В и $-0,6$ В со скоростью развертки 50 мВ/с. Приложенный потенциал измерен относительно электрода сравнения.

затем в другом. Схема установки для циклической вольтамперометрии в обычной трехэлектродной системе приведена на рис. 6-1. Ток течет от электрода X к электроду Y, а электрод сравнения Z служит для измерения прикладываемого потенциала. Типичная зависимость потенциала от времени приведена на рис. 6-2.

3.2. Прибор и методика

Ячейки с тремя электродами весьма разнообразны по конструкции. Они должны иметь водяную рубашку для термостатирования, поскольку пиковые значения тока зависят от температуры, а также устройство для продувания инертного газа, такого как азот или аргон, вытесняющего кислород. В качестве электрода сравнения обычно используют насыщенный каломельный электрод (н. к. э.) или хлорсеребряный электрод (Ag/AgCl), содержащий в качестве электролита KCl. Электрод сравнения (Z на рис. 6-1) и рабочий (фермент-кофакторный) электрод (X на рис. 6-1) необходимо размещать как можно ближе друг к другу, чтобы свести к минимуму нескомпенсированное сопротивление раствора, которое может стать причиной ошибок при измерении прикладываемого потенциала. Вспомогательный электрод (Y на рис. 6-1), который обычно представляет собой кусочек платиновой проволоки или сетки, часто изолируют от двух других электродов с помощью пористого стекла, чтобы оградить рабочий электрод и электрод сравнения от продуктов, образующихся около вспомогательного электрода. Для наложения потенциала со скоростью развертки до 50 мВ/с и измерения силы возникающего тока можно использовать потенциостаты фирмы Princeton Applied Research (Model 174A и Model 273) или фирмы BAS (Model 100). Для регистрации зависимости силы

тока от потенциала используют двухкоординатный самописец или (при высоких скоростях развертки) осциллограф с памятью.

Эксперимент начинают с укрепления электродов в ячейке, добавления электролита, буферного раствора и субстратов и продувания через раствор азота для удаления растворенного кислорода. После этого продолжают продувать азот над поверхностью раствора для предотвращения доступа кислорода воздуха. Развертку потенциала начинают с такого его значения, при котором ни одно из присутствующих веществ не подвергается окислению или восстановлению. Направление первого цикла развертки определяется состоянием окисления компонентов системы. Если компоненты находятся в окисленном состоянии, то первый цикл начинают в направлении более отрицательного потенциала, чтобы образовывались восстановленные формы и возникал ток восстановления, или катодный ток. Вместе с тем если в исходном состоянии присутствуют восстановленные вещества, то первый цикл развертки начинают в направлении более положительного потенциала. В этом случае возникает ток окисления, или анодный ток.

3.3. Результаты и интерпретация

Сначала полезно обсудить результаты для электроактивных веществ, находящихся в растворе (не связанных с поверхностью электрода), а затем — для веществ, присоединенных к электроду.

Типичная циклическая вольтамперограмма для электроактивных веществ в перемешиваемом растворе показана на рис. 6-3. Поскольку в исходном состоянии в растворе присутствуют вещества в окисленном состоянии, развертку в этом примере начинают примерно от $+0,2$ В и ведут ее со скоростью $1-100$ мВ/с в направлении более отрицательных потенциалов (т. е. в сторону увеличения восстанавливающей способности). Потенциал, постепенно становясь все более отрицательным, достигает, наконец, некоторого значения (около $-0,20$ мВ на рис. 6-3), при котором окисленный кофактор C_{ox} начинает восстанавливаться. Этот перенос электронов вызывает увеличение силы тока, которая достигает некоторого максимального значения i_{pc} , поскольку концентрация кофактора в непосредственной близости от поверхности электрода начинает снижаться из-за его расходования (т. е. восстановления), а скорость притока дополнительных количеств окисленного кофактора из основной массы раствора ограничена скоростью его диффузии. При еще более отрицательных значениях потенциала ток восстановления уже лимитируется скоростью диффузии окисленного кофактора к поверхности электрода. Здесь направление развертки меняют на противоположное, и восстановленный кофактор теперь подвергается окислению. В примере на рис. 6-3 это происходит примерно при $-0,35$ В. Стандартный электродный потенци-

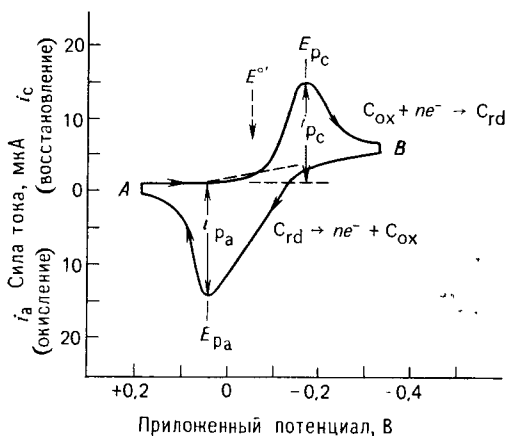


Рис. 6-3. Типичная зависимость тока от потенциала для одного цикла развертки циклической вольтамперограммы электроактивных веществ в растворе. Развертка потенциала между +0,20 В и -0,35 В. Стрелки на графике указывают направление развертки. Измерение начинают в точке А в случае окисленного вещества или в точке В в случае восстановленного вещества. Результаты приведены для случая постоянной скорости развертки. Объяснение символов см. в тексте.

ал $E^{0'}$ для реакции окисления-восстановления кофактора определяют следующим образом:

$$C_{ox} + ne = C_{rd}$$

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[C_{ox}]}{[C_{rd}]} \quad (2)$$

где символы в квадратных скобках обозначают концентрации соответствующих веществ, T — температура, R — газовая постоянная, F — постоянная Фарадея и E — измеряемый или действующий потенциал. Таким образом, $E^{0'}$ — это измеряемый потенциал (по отношению к стандартному водородному электроду), при котором $[C_{ox}] = [C_{rd}]$. Для циклической вольтамперометрии в случае электроактивных веществ, находящихся в растворе (рис. 6-3), разность потенциалов пиков окисления и восстановления E_{pa} и E_{pc} составляет $0,059/n$ (n — число переносимых электронов), поскольку процесс протекает в диффузионно контролируемых условиях. Таким образом, значение $E^{0'}$ расположено посередине между значениями E_{pc} и E_{pa} . Силу тока в пиках i_{pa} и i_{pc} для обратимой реакции при 25 °С можно найти по уравнению (3):

$$i_{pc} = (2,69 \cdot 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} \nu^{1/2} [C^*]_0, \quad (3)$$

где A — площадь поверхности электрода (см^2), D_0 — коэффициент

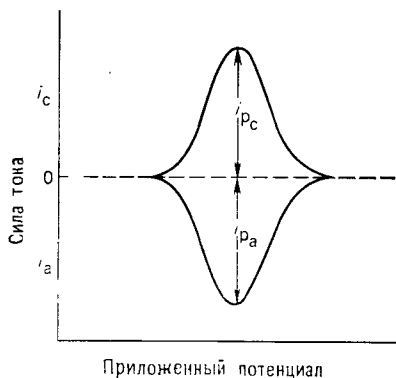


Рис. 6-4. Циклическая вольтамперограмма в случае электроактивного вещества, присоединенного к поверхности электрода при полном отсутствии электроактивных веществ в растворе и при быстром обратимом переносе электронов.

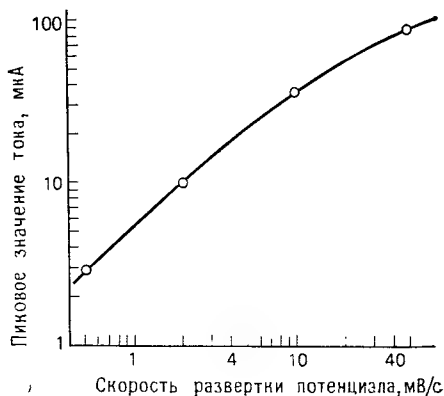


Рис. 6-5. Зависимость пикового значения тока от скорости развертки потенциала в двойных логарифмических координатах для FAD, ковалентно присоединенного к стекловидному углероду с использованием 6-аминокапроновой кислоты в качестве спейсера. Перепечатано из работы [12] с разрешения издательства.

диффузии окисленного кофактора ($\text{см}^2/\text{с}$), v — скорость развертки ($\text{В}/\text{с}$) и $[C_o^*]$ — концентрация окисленного кофактора в основной массе раствора. Здесь уместно отметить два обстоятельства. Во-первых, значение i_p прямо пропорционально квадратному корню из скорости развертки; во-вторых, если процесс не полностью обратим, то $E_{pa} - E_{pc} > 0,059/n$.

Если электроактивные вещества присоединены к поверхности электрода, а в растворе они отсутствуют, то циклическая вольтамперограмма имеет другой вид. Поскольку все вещества, участвующие в окислении — восстановлении находятся на поверхности электрода, диффузионные эффекты уже не проявляются. Таким образом, пики окисления и восстановления симметричны, и их положение совпадает со значением $E^{0'}$, как показано на рис. 6-4. Другим отличием рассматриваемого случая от предыдущего является пропорциональность i_p скорости развертки в первой степени, а не в степени $1/2$. Поэтому хорошим способом выяснить, находится ли электроактивное вещество в растворе или оно иммобилизовано на поверхности электрода, является построение зависимости i_p от скорости развертки в двойных логарифмических координатах. При этом методом иммобилизации может быть ковалентное или ионное связывание, комплексобразование или адсорбция. Например, на рис. 6-5 в случае FAD, ковалентно присоединенного к электроду из стекловидного углерода, такая зависимость при низких скоростях

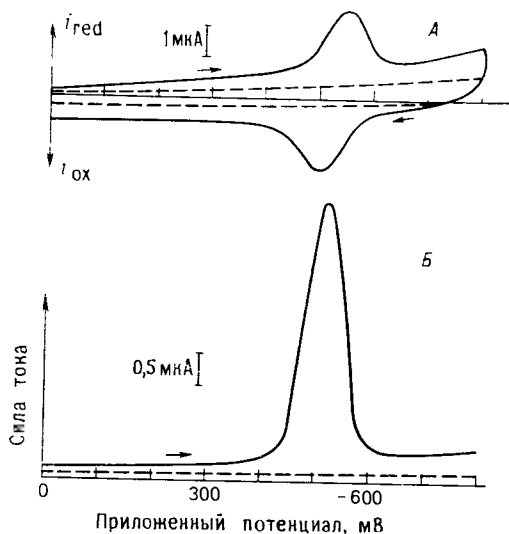


Рис. 6-6. Циклическая (А) и дифференциальная импульсная (В) вольтамперограмма для FAD, адсорбированного на электроде из стекловидного углерода (сплошная линия). Измерения проводили со скоростью развертки потенциала 50 мВ/с в 0,1 М трис-буфере, pH 8,0, при 25°C в анаэробных условиях. Потенциал измеряли относительно хлорсеребряного электрода. Контрольные измерения (штриховая линия) проводили в тех же условиях с электродом, не содержащим адсорбированного FAD. Перепечатано из работы [13] с разрешения издательства. Авторские права принадлежат издательству John Wiley and Sons Inc., 1984 г.

развертки имеет тангенс угла наклона 0,9, как и ожидалось на основании вышеизложенных соображений.

Приведенное описание результатов циклической вольтамперометрии основано на предположении, что скорости переноса электронов достаточно велики по сравнению со скоростью развертки прикладываемого потенциала. При более высоких скоростях развертки это условие перестает выполняться и реакция протекает скорее в кинетическом режиме, чем в термодинамически равновесных условиях. Неравновесность условий влечет за собой увеличение разности между E_{pa} и E_{pc} как в случае растворенных, так и иммобилизованных веществ. По зависимости положения пика от скорости развертки можно определить константу скорости реакции; однако рассмотрение этого подхода выходит за рамки данной главы. Сдвиг пика для кофактора FAD, адсорбированного на электроде из стекловидного углерода (0,1 М трис-буфер, pH 8,0, 25°C и скорость развертки 50 мВ/с), показан на рис. 6-6, А.

При любой электрохимической процедуре, при которой прикладываемый потенциал непрерывно изменяется, возникает ток,

обусловленный перестройкой двойного электрического слоя вблизи поверхности электрода. Его называют зарядным током. Нас интересует другой компонент i_p , известный как фарадеевский ток. Для его определения базовую линию нужно выбрать так, чтобы исключить влияние зарядного тока. Так как на перестройку двойного электрического слоя диффузия не влияет, величина зарядного тока зависит от скорости развертки в первой степени. Поэтому при высоких скоростях развертки и большой площади поверхности электродов зарядный ток, или фоновый компонент измеряемого тока, может стать слишком большим.

Если электроактивное вещество иммобилизовано на поверхности электрода, то его общее количество можно определить, интегрируя по времени фарадеевский компонент пика. Интегрирование тока по времени дает количество энергии в кулонах, перенесенной в процессе окисления или восстановления ($A = \int I dt$); при этом для окисления или восстановления каждого эквивалента переносится 96 485 Кл. Зная эквивалентный вес, можно рассчитать количество иммобилизованного вещества в молях или граммах. Поделив это значение на площадь поверхности электрода, получают величину «нагрузки» на единицу площади. Покрытие поверхности монослоем вещества обычно дает значение «нагрузки» приблизительно 10^{-10} моль/см². Площадь поверхности также можно определить электрохимически, используя ферроцианид калия и импульсную вольтамперометрию. При этом к электроду каждые 0,5 с прикладывают кратковременные (несколько миллисекунд) импульсы потенциала и измеряют возникающий ток. При линейном возрастании амплитуды импульсов достигается потенциал окисления ферроцианида. Измеренное при этом значение фарадеевского тока можно использовать для расчета электрохимически эффективной площади поверхности электрода, которая зачастую бывает значительно больше, чем геометрическая площадь поверхности. Благодаря кратковременности импульсов окисление ферроцианида происходит лишь внутри нескольких атомных слоев у поверхности электрода, что повышает точность метода.

Подводя итоги, отметим, что с помощью циклической вольтамперометрии, а именно по виду зависимости i_p от скорости развертки в двойных логарифмических координатах, действительно можно установить, иммобилизованы ли на поверхности электрода окислительно-восстановительный фермент или кофактор. Другими важными параметрами метода, которые также представляют собой функции скорости развертки, являются E_p , i_p , разность между E_{pa} и E_{pc} и форма пиков. Наиболее сложной задачей в интерпретации циклических вольтамперограмм часто бывает выбор положения базовой линии, от которой измеряют значения i_p . Тем не менее этот метод имеет большие возможности и широко применяется.

4. Дифференциальная импульсная вольтамперометрия с использованием иммобилизованных веществ

4.1. Метод и аппаратура

Чувствительность метода циклической вольтамперометрии можно значительно повысить, если регистрировать не силу тока, а производную этой величины и проводить измерение в тот момент, когда зарядный ток падает до нуля. Это и есть сущность метода дифференциальной импульсной вольтамперометрии. На линейно возрастающий потенциал, прикладываемый к рабочему электроду, накладывают серию кратковременных импульсов, как показано на рис. 6-7, А. Для работы в дифференциально-импульсном режиме можно использовать ту же трехэлектродную систему, которая изображена на рис. 6-1, но потенциостат должен иметь дополнительные возможности: а) для генерации импульсов; б) для измерения тока перед началом и концом каждого импульса; в) для выдачи на выходе разности значений тока перед началом и концом каждого импульса.

Таким выбором моментов измерения тока устраняется влияние зарядного тока, который максимален в начале каждого импульса, но за несколько миллисекунд падает до нуля.

4.2. Результаты и их интерпретация

Типичная дифференциальная импульсная вольтамперограмма представлена на рис. 6-7, Б. В случае электроактивного вещества, иммобилизованного на поверхности электрода, на протяжении одного пика развертки потенциала оно подвергается окислению или восстановлению; при этом ток возрастает, достигает максимального значения и затем снижается почти до нуля. Это показано на рис. 6-6, Б для FAD, адсорбированного на стекловидном угле-роде. Пик симметричен относительно стандартного электродного потенциала E^0' , правда кинетические факторы могут вызывать его сдвиг [16]. Используя соответствующую калибровочную кривую, можно определять количество электроактивного вещества, иммобилизованного на поверхности электрода, по высоте пика. Поскольку высота пика может изменяться в зависимости от нескомпенсированного сопротивления раствора или цепи измерения тока, калибровку и измерения необходимо проводить в одних и тех же условиях [16].

Итак, дифференциальная импульсная вольтамперометрия является одним из наиболее чувствительных методов для обнаружения следовых количеств веществ, как находящихся в растворе, так и иммобилизованных на поверхности электрода. В случае иммобилизованных веществ калибровка высоты пика для получения количественной информации может быть затруднительна, однако этот

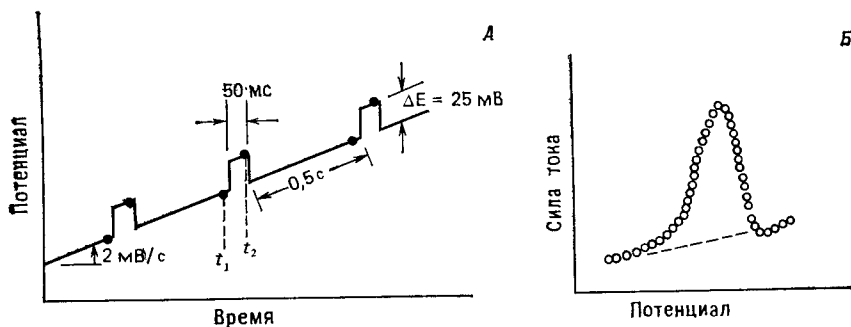


Рис. 6-7. Дифференциальная импульсная вольтамперометрия. А. Зависимость приложенного потенциала от времени; приведены типичные параметры скорости развертки и накладываемых импульсов потенциала. Черными кружками отмечены моменты регистрации тока. Разность значений тока, измеренных в моменты времени t_1 и t_2 для каждого импульса, откладывают как функцию приложенного потенциала. Эта зависимость представлена светлыми кружками на рис. Б. Штриховая линия соответствует контрольному току (т. е. току в отсутствие электроактивных веществ).

метод широко применяется для идентификации иммобилизованных веществ по положению потенциала пика.

5. Определение сопротивления массопереносу с помощью вращающихся электродов

Некоторые электрохимические методы анализа электроактивных веществ в растворе основаны на том, что самой медленной стадией всего процесса является диффузия через неперемешиваемый слой, прилегающий к поверхности электрода. Мы уже говорили об этом при обсуждении максимальных значений тока в циклической вольтамперометрии [уравнение (3), разд. 3.3]. Еще один метод, основанный на измерении тока, лимитируемого диффузией, заключается в приложении линейно возрастающего потенциала к вращающемуся дисковому электроду. Этот метод будет рассмотрен подробнее, поскольку он может служить основой для измерения диффузионных сопротивлений переносу электроактивных веществ через носитель с иммобилизованным ферментом.

Устройство вращающегося дискового электрода с кольцом (ВДЭК) и схема его подключения представлены на рис. 6-8. Превосходным прибором для такого рода исследований является потенциостат с ротатором фирмы Pine Instrument Co. со сменным платиновым дисковым электродом. Кольцо и диск разделены слоем тефлонового изолятора и соединены с потенциостатом. Для проведения вольтамперометрических или других электрохимических измерений как на кольце, так и на диске используют электрохими-

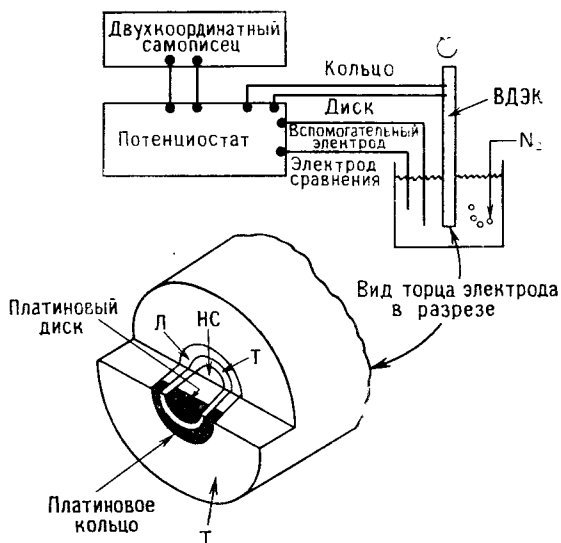


Рис. 6-8. Вращающийся дисковый электрод с кольцом (ВДЭК) и схема его подключения. Т — тефлон, НС — нержавеющая сталь, Л — латунь. Диаметр диска 0,50 см. Внутренний диаметр кольца 0,75 см, внешний 0,85 см. Перепечатано из работы [5] с разрешения издательства. Авторские права принадлежат American Chemical Society, 1984 г.

ческую ячейку с электродом сравнения и вспомогательным электродом, аналогичную описанной выше. При вращении электрода продукт любой реакции, протекающей у диска, отбрасывается центробежной силой к кольцу, где его можно обнаружить электрохимически. Если на диске находится иммобилизованный фермент, то на кольце можно регистрировать продукты ферментативной реакции. Кроме того, можно оценить скорость диффузии электроактивных веществ через носитель с иммобилизованным ферментом, присоединенный к диску. Если температура, используемая при иммобилизации, не превышает $25 \pm 10^\circ \text{C}$, и если при этом отсутствуют высокоактивные реагенты, то ферменты и кофакторы можно ковалентно присоединить непосредственно к диску, являющемуся частью самого электрода. Однако при более высокой температуре или при использовании очень активных реагентов термическое расширение или сжатие или же химическое воздействие на электрод могут вызвать утечку тока в местах стыка тефлоновой изоляции и диска, что может привести к возникновению артефактов.

Ферменты или кофакторы можно ковалентно присоединить к платиновому диску, используя активацию платины алкиламиносиланом или аллиламином с последующим сшиванием «заякоренного» амина с аналогичной группой присоединяемого вещества глу-

таровым альдегидом [5]. Для присоединения ферментов с использованием алкиламиносилана платиновый диск очищают, окисляют, отсоединяют от электрода и активируют алкиламиносилом, как описано в разд. 2.2, после чего аминогруппы модифицируют глутаровым альдегидом. Присоединение фермента осуществляют, помещая активированный диск в раствор глюкозооксидазы (2,5 мг/мл) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,0) на 4 ч при 4°C. Для присоединения фермента с использованием аллиламина проводят предварительную электрохимическую обработку диска, изменяя потенциал сначала плавно от +400 мВ до +1300 мВ со скоростью развертки 0,5 В/мин, затем скачкообразно до -300 мВ и, наконец, скачкообразно до +400 мВ и поддерживая это значение в течение 2 мин. При последующем погружении диска в 4%-ный водный раствор аллиламина аллильные группы двойной связью присоединяются к поверхности оксида платины. Фермент присоединяют, помещая диск в буферный раствор описанного выше состава, содержащий 1% глюкозооксидазы и около 1,25% глутарового альдегида, на 4 ч при 4°C. И в том и в другом случае диск с иммобилизованным ферментом промывают буфером, дают ему нагреться до комнатной температуры и снова монтируют на электроде.

Используя глюкозооксидазу, присоединенную к диску, можно электрохимически измерить коэффициент диффузии электроактивного вещества, например ферроцианида калия, через слой иммобилизованного фермента. В этом случае кольцо электрода не используют и нигде не подключают. При вращении электрода жидкость у поверхности диска вследствие своей вязкости также приходит во вращение. Возникающая в результате этого центробежная сила отбрасывает жидкость вдоль плоскости диска в радиальном направлении. При постоянной скорости вращения лимитирующим фактором электрохимической реакции становится скорость диффузии электроактивного вещества из основной массы раствора к поверхности электрода через линии тока жидкости. В этих условиях ток, текущий через диск, называют предельным током i_l . Его значение можно с достаточно высокой точностью определить в соответствии с уравнением (4) [2]:

$$i_l = 0,62nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}[G^*_{rd}], \quad (4)$$

где ω — скорость вращения (рад/с), ν — кинематическая вязкость (см²/с), $[G^*_{rd}]$ — концентрация ферроцианида калия в основной массе раствора, F — постоянная Фарадея, A — площадь поверхности диска и D — коэффициент диффузии. Остальные символы были определены ранее. Значение коэффициента диффузии определяют из графика зависимости предельного тока от квадратного корня из скорости вращения электрода при постоянной $[G^*_{rd}]$. Для этого используют тангенс угла наклона кривой, отражающей эту зависимость, и уравнение (4).

Электрод, вращающийся с постоянной скоростью, помещают

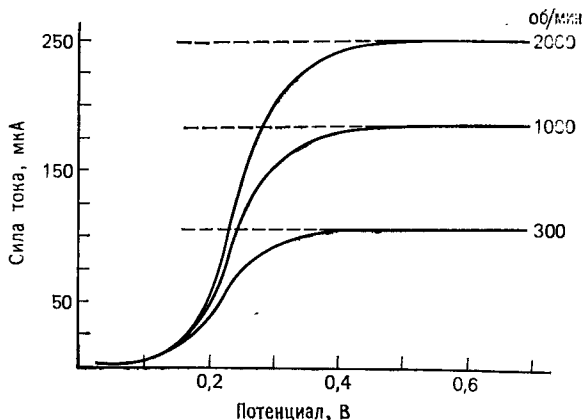


Рис. 6-9. Окисление ферроцианида калия на вращающемся дисковом электроде, на котором с помощью γ -аминопропилтриэтоксисилана и глутарового альдегида ковалентно иммобилизована глюкозооксидаза. В основной массе раствора содержится 1,95 М ферроцианид калия и 1 М KCl. Скорость развёртки потенциала 2 В/мин (относительно хлорсеребряного электрода). Штриховые линии указывают значения предельных токов. Перепечатано из работы [5] с разрешения издательства. Авторские права принадлежат American Chemical Society, 1984 г.

при 25 °С в раствор, содержащий 1,95 М ферроцианид калия и 1 М KCl (в качестве электролита). К электроду прикладывают потенциал, линейно возрастающий от $-0,10$ В до $+0,70$ В (по отношению к хлорсеребряному электроду сравнения). Для окислительно-восстановительной пары ферроцианид/феррицианид E^0' составляет около $+0,36$ В (по отношению к нормальному водородному электроду) или же около $+0,14$ В (по отношению к хлорсеребряному электроду). Следовательно, ферроцианид будет интенсивно окисляться при значениях приложенного потенциала, превышающих $0,2$ В (по отношению к хлорсеребряному электроду). Результаты, полученные при трех различных скоростях вращения, представлены на рис. 6-9. При увеличении скорости вращения диффузионный слой у поверхности электрода становится тоньше, что увеличивает скорость диффузии через него. Концентрация ферроцианида у поверхности электрода постоянно держится практически на нулевом уровне, поэтому градиент концентрации и, следовательно, скорость диффузии определяются непосредственно толщиной диффузионного слоя. Если построить график зависимости, как описано выше, используя значения предельного тока и скоростей вращения, приведенные на рис. 6-9 и полученные при других скоростях вращения, то прямая, проведенная через точки этой зависимости, описывается уравнением (5) с коэффициентом корреляции 0,999:

$$i_1 = 15,9\omega^{1/2} + 17,2 \quad (5)$$

Из значения площади поверхности диска, равного $0,196 \text{ см}^2$, и $\gamma = 0,01 \text{ см}^2/\text{с}$ для воды можно рассчитать, что коэффициент диффузии равен $0,57 \pm 0,05 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$. Как и следовало ожидать, это значение немного меньше, чем коэффициент диффузии ферроцианида калия, определенный в воде с использованием платинового диска, не содержащего иммобилизованного фермента ($0,61 \pm \pm 0,03 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$) [5].

Электрохимические методы, используемые для определения коэффициентов диффузии электроактивных веществ через слой иммобилизованного фермента, можно также применять для определения кинетических констант иммобилизованных ферментов. Этот метод слишком сложен, чтобы объяснить его здесь подробно и полностью [5]. Вкратце он заключается в следующем. В раствор, в котором вращается ВДЭК, вносят субстрат. Фермент, например глюкозооксидаза, иммобилизован на диске, и ВДЭК вращается с постоянной скоростью. Ключевым условием метода является наличие электрохимической активности у одного из продуктов. В случае глюкозооксидазы продуктом является пероксид водорода, который электроактивен. Скачкообразно изменяя потенциал кольца от значения $-0,02 \text{ В}$, при котором H_2O_2 не подвергается электрохимическим превращениям, до $+0,80 \text{ В}$, что заведомо превышает значение, требуемое для быстрого окисления, по току кольца можно определить скорость образования H_2O_2 , т. е. скорость, с которой H_2O_2 достигает кольца. Аналогично методу Иди — Хофсти, используемому для линеаризации уравнения Михаэлиса — Ментен для односубстратной реакции в терминах скоростей реакции, можно представить это уравнение в терминах тока:

$$i_{ss} = i_{\max} - K'_M \left(\frac{i_{ss}}{[G^*]} \right) \quad (6)$$

где i_{ss} — стационарный ток, измеренный через несколько минут после скачка потенциала, приложенного к кольцу, $i_{\max}$ — стационарный ток при максимальной скорости реакции, катализируемой глюкозооксидазой, K'_M — кажущаяся константа Михаэлиса, а $[G^*]$ — концентрация глюкозы в основной массе раствора. Как было показано, для иммобилизованной глюкозооксидазы график зависимости i_{ss} от $i_{ss}/[G^*]$ представляет собой прямую линию [5], что подтверждает применимость данного метода.

6. Краткое содержание и выводы

Циклическая и дифференциальная импульсная вольтамперометрия широко используются как качественные и в некоторой степени количественные методы изучения свойств электроактивных веществ, иммобилизованных на поверхности электродов. В частности, дифференциальный метод обладает очень высокой чувствительностью, так что его можно применять при заполнении поверх-

ности молекулами даже меньше, чем в один слой. Для измерения сопротивлений массопереносу, создаваемых слоем иммобилизованного вещества, можно использовать другие электрохимические методы, из которых два были упомянуты в данной главе. Вне всякого сомнения, по мере разработки разнообразных электродов с иммобилизованными ферментами или парами фермент — кофактор электрохимические методы будут применяться еще шире. В этих методах электроды не повреждаются, так что один и тот же электрод с иммобилизованным ферментом или кофактором можно сначала использовать в электрохимических экспериментах, а затем в исследованиях другого рода.

Благодарность

Эта работа финансировалась грантами Национального института здравоохранения (R01AM26370), Национального научного фонда (CPE8107715) и Управления научных исследований вооруженных сил (DAAG2982K0064). Автор выражает признательность д-ру Джеймсу Ф. Кэстнеру, д-ру Осато Мияваки и д-ру Кришне Нарасимхану за участие в исследованиях.

Литература

1. Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry (Kissinger P. T. and Heineman W. R., eds.) Marcel Dekker, New York, 1984.
2. Bard A. J., Faulkner L. R. In: Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, John Wiley, New York, 1980.
3. Wingard L. B., Jr. In: Enzyme Engineering: Future Directions (Wingard L. B., Jr., Berezin I. V., Klyosov A. A., eds.), p. 339, Plenum Press, New York, 1980.
4. Wingard L. B., Jr. In: Proc. Biotech 83, p. 613, Online Publications Ltd., Northwood (UK), 1983.
5. Castner J. F., Wingard L. B., Jr. Biochemistry (Wash.), **23**, 2203 (1984).
6. Murray R. W. Acc. Chem. Res., **13**, 135 (1980).
7. Wingard L. B., Jr., Ellis D., Yao S. J., Schiller J. G., Liu C. C., Wolfson S. K., Jr., Drash A. L. J. Solid Phase Biochem., **4**, 253 (1979).
8. Van der Linden W. E., Dieker J. W. Anal. Chim. Acta, **119**, 1 (1980).
9. Engstrom R. C. Anal. Chem., **54**, 2310 (1982).
10. Miller C. W., Karweik D. H., Kuwana T. Anal. Chem., **53**, 2319 (1981).
11. Wingard L. B., Jr., Gurecka J. L., Jr. J. Mol. Catal., **9**, 209 (1980).
12. Miyawaki O., Wingard L. B., Jr. Biochim. Biophys. Acta, **838**, 60 (1985).
13. Miyawaki O., Wingard L. B., Jr. Biotechnol. Bioeng., **26**, 1364 (1984).
14. Adams R. N. Electrochemistry at Solid Electrodes, Marcel Dekker, New York, 1969.
15. Narasimhan K., Wingard L. B., Jr. Enzyme Microbial Technol, in press (1985).
16. Brown A. P., Anson F. C. Anal. Chem., **49**, 1589 (1977).

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТКИ: ТРАНСФОРМАЦИЯ СТЕРОИДОВ

К. А. Кощеевко, Г. В. Суходольская

1. Введение

За последнее десятилетие в значительной степени увеличился интерес к проблеме микробиологической трансформации и биосинтезу органических соединений на основе новых методов проведения этих процессов, особенно в связи с применением иммобилизованных микробных клеток (ИК). Использование иммобилизованных микроорганизмов как биокатализаторов имеет множество преимуществ перед свободными клетками и перед иммобилизованными ферментами [1—4]. Благодаря своей высокой эффективности ИК широко применяются в одностадийных и полиферментных процессах при получении аминокислот, органических кислот, антибиотиков, ферментов, коферментов и углеводов [1, 3]. ИК исследуются также весьма активно в связи с их применением при очистке промышленных сточных вод от органических и неорганических загрязнений, при изготовлении электродов в аналитических целях [1, 3, 5].

Особое внимание обращено на использование ИК при трансформациях стероидных соединений. Хорошо известно, что некоторые стероидтрансформирующие ферменты, особенно гидроксилазы и дегидрогеназы, являются весьма лабильными белками, их выделение и очистка затруднены. ИК могут быть в этих случаях активными полиферментными системами, регенерирующими необходимые им кофакторы.

Стероидные соединения были одними из первых субстратов, которые трансформировали с помощью ИК. Первая статья на эту тему опубликована в 1970 г., она посвящена 11β -гидроксилированию кортексолона с помощью *Curvularia lunata*, включенной в полиакриламидный гель (ПААГ) [6].

Анализ статей, касающихся различных модификаций стероидных соединений с помощью ИК, показывает, что многие исследователи сосредоточили свое внимание на особенно важных для практики процессах: Δ^1 -дегидрировании, 11α - и 11β -гидроксилировании и трансформации стерина до C_{19} - и C_{22} -стероидов [1—4, 6—10]. При этом можно выделить несколько направлений исследований, включающих применение поврежденных и интактных микробных клеток. Некоторые успехи достигнуты при использовании природных и синтетических полимеров для иммобилизации

бактерий, дрожжей и грибов, а также при проведении процессов в водноорганических двухфазных системах [11—14].

Исследования морфологических и физиолого-биохимических особенностей ИК во время иммобилизации и трансформации позволяют надеяться, что применение живых ИК очень перспективно.

Природная локализация и взаимосвязь ферментных систем в интактных клетках обеспечивает их стабильность. В связи с этим особую важность приобретает вопрос о сохранении жизнеспособности клеток в ходе иммобилизации и при их последующем использовании.

В этой главе представлены экспериментальные данные о применении живых клеток *Arthrobacter globiformis* для Δ^1 -дегидрирования, Δ^1 - и 20 β -восстановления, *Saccharomyces cerevisiae* ВКМу-488 для проведения стереоспецифического 17 β -восстановления и *Tieghemella orchidis* ИБФМ-223 для 11 α - и 11 β -гидроксилирования стероидных соединений, а также о возможных путях сохранения ИК в жизнеспособном состоянии.

2. Материалы и методы, используемые при трансформации стероидов

Были использованы следующие реагенты: гидрокортизон (11 β , 17 α , 21-тригидрокси-4-прегнен-3,20-дион) фирмы Rusel Uclaf (Франция) и завода «Акрихин» (СССР), преднизолон (11 β , 17 α , 21-тригидрокси-1,4-прегнадиен-3,20-дион), кортизон (17 α , 21-дигидрокси-4-прегнен-3,11,20-трион), преднизон (17 α , 21-дигидрокси-1,4-прегнадиен-3,11,20-трион), кортизоацетат, преднизонацетат, кортексолон (вещество «S» Рейхштейна; 17 α , 21-дигидрокси-4-прегна-3,20-дион) завода «Акрихин» (СССР). Секостероиды 3-метокси- $\Delta^{1,3,5(10),9,(11)}$ -8,14-секоэстратетраендиол-3,17 β -он-14, андростендион (андростен-4-дион-3,17), андростадиендион (андростадиен-1,4,-дион-3,17) получены из лаборатории физиологически активных соединений ИБХ АН СССР. 21-фосфат кортексолона получен из отдела химии гормональных стероидов ВНИХФИ Минмедбиопроба.

Применяли также акриламид (АА), NN'-метиленабисакриламид (МБА), персульфат аммония, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД) [Reanal (Венгрия) и Serva (ФРГ)] (перед использованием акриламид фирмы Reanal перекристаллизовывали один или два раза [82]); поливиниловый спирт (ПВС) — ГОСТ 150214 МРТУ6-09-400467; каррагинан (Serva) и альгинат кальция (BDH, Англия).

Адсорбенты для клеток: порошковая целлюлоза ТУ-6-09-3575-74, фракция 0,5 мм; целлюлоза для хроматографии FND-9303, микрокристаллическая целлюлоза LK для хроматогра-

фии (Chemapol, СССР), ДЭАЭ-целлюлоза; силикагель (Chemapol L, СССР, 40/100 мкм).

Фоточувствительные полимеры — полиэтиленгликольдиметакрилат и его производные, например полиэтиленгликольгидроксипропилакрилат, — получены от проф. С. Фукуи (Университет в Киото, с/х факультет, отдел промышленной химии). Источники остальных реактивов указаны ниже: никотинамидадениндинуклеотид восстановленный, феназинметосульфат, твин 20, 40, 60, 80, спэн 40, 60, 80, ДСН, лаурилсульфат натрия, цетилтриметиламмонийбромид, хлорамфеникол (Serva, ФРГ), менадион (Calbiochem, Швейцария); глутаровый альдегид, осмиевая кислота, какодилатный буфер (Serva, ФРГ), Araldit M, Araldit Hardener, DMP-30 (Fluke, Швеция). Реактивы для хроматографии, приготовления сред и других целей использовали марки «хч» или «ч» (СССР).

2.1. Δ^1 -Дегидрирование стероидных соединений

Среди различных модификаций стероидных соединений реакция микробиологического Δ^1 -дегидрирования является одной из самых важных с практической точки зрения, так как введение двойной связи в положение 1—2 стероидного ядра приводит к получению физиологически активного стероида.

Мы использовали культуру *A. globiformis* 193 для Δ^1 -дегидрирования и восстановления кетогруппы в 20-м положении. Характер этих ферментативных трансформаций определялся рядом факторов: составом и редокс-потенциалом среды, биомассой и условиями аэрации массообмена [15, 16].

В этой части главы представлены экспериментальные методы, используемые для Δ^1 -дегидрирования гидрокортизона и некоторых других стероидных соединений с помощью ИК (схема 7-1).

Реакция Δ^1 -дегидрирования катализируется внутриклеточным ферментом 3-оксостероид — Δ^1 -дегидрогеназой (КФ 1.3. 99.4). В клетках *A. globiformis* этот фермент локализован в цитоплазматической мембране, вероятно, на ее внешней стороне, обращенной к периплазме [17, 18]. Δ^1 -Дегидрирование гидрокортизона в преднизолон с потреблением кислорода происходит в присутствии интактных бактериальных клеток и препарата цитоплазматических мембран, полученных при разрушении ультразвуком.

Это превращение ингибируется цианидом и 2-н-нонил-4-гидроксихинолин-N-оксидом. В обоих случаях, с интактными клетками и с препаратом цитоплазматических мембран, окисление гидрокортизона сопровождается восстановлением цитохромов. В аэробных условиях Δ^1 -дегидрирование гидрокортизона происходит при генерации энергии в виде трансмембранного потенциала. Следовательно, электроны переносятся с 3-оксостероид- Δ^1 -дегидрогеназы на кислород через дыхательную цепь [17, 18].

Таблица 7-1. Условия роста культуры *A. globiformis*

Рост на твердой питательной среде		Рост на жидкой питательной среде	
состав среды	продолжительность роста и условия	инкулят	трансформирующая культура
		состав среды и объем	продолжительность роста и условия
Кукурузный экстракт (1%), глюкоза (1%), агар-агар (3%), pH 6,8—7,23	3—4 сут, 29 °C	Кукурузный экстракт (1%), глюкоза (1%), pH 6,8—7,2, 150 мл	Кукурузный экстракт (1%), глюкоза (1%), pH 6,8—7,2, 150 мл
		24 ч (220 об/мин), 29 °C, 2—3 мл клеточной суспензии (A=0,35—0,4 при разведении 1 : 9, кювета 0,5 см)	24 ч (220 об/мин), 29 °C, 10 мл инокулята, индуктор Δ^1 -дегидрогеназы: 20 мг ацетата кортизона в 1 мл этанола на 100 мл среды

Таблица 7-2. Реагенты, используемые для получения полиакриламидного геля¹⁾

Раствор мономера	Суспензия клеток	Раствор инициатора полимеризации	Раствор катализатора полимеризации
Акриламид 1,9 г МБА 0,1 г Дистиллированная вода 11 мл	6 мл клеток в буферном растворе	Персульфат аммония 15 мг Дистиллированная вода 3 мл	ТЕМЭД 0,1 мл

¹⁾ Все реагенты производства фирмы «Reanal», акриламид перекристаллизован. Раствор персульфата аммония должен быть свежеприготовленным. Общий объем полимеризационной смеси 20,1 мл. Полимеризацию проводят в атмосфере обычного воздуха или инертного газа.

акриламида со связывающим реагентом, обычно МБА. В качестве инициатора используют персульфат аммония и в качестве катализатора — ТЕМЭД [19].

Полимеризацию проводят в тонкостенном стакане (диаметр дна 10 см), который помещают в кристаллизатор, наполненный льдом.

1. Предварительно охлажденные растворы реагентов, указанные в табл. 7-2, и клеточную суспензию аккуратно помещивают в стакане. Начало полимеризации сопровождается помутнением полимеризационного раствора и увеличением вязкости смеси; это происходит спустя 1—2 мин после объединения реагентов.
2. Стакан с гелем ставят в холодильник на 10—15 мин при -4°C для завершения процесса образования геля при пониженной температуре (толщина блока геля не должна превышать 0,6 см). При увеличении объема полимеризационной смеси это условие должно быть соблюдено для стабилизации температурного режима в ходе полимеризации. Не рекомендуется оставлять блок геля более чем на 2 ч после полимеризации. Более длительное хранение клеток в блоке при комнатной температуре приводит к снижению их ферментативной активности и жизнеспособности.
3. Блок геля с клетками механически измельчают с помощью сита (величина отверстий 0,8—1,0 мм в диаметре). Суспензию гранул декантируют повторно 4—5 л 0,01 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,2, или физиологического раствора, чтобы отделить гранулы равной величины, а также удалить невключившиеся клетки и реагенты.

При изучении морфофизиологических особенностей иммобилизованных клеток, осуществляющих трансформацию стероидных соединений, все процедуры, включая приготовление бактериальной суспензии, иммобилизацию, приготовление гранул, трансформацию, должны проводиться в строго асептических условиях.

Прирост биомассы, включенной в гель при инкубации в питательной среде, определяют весовым методом или по анализу белка [20]. Показано, что после введения в блок геля 100 мг и 600 мг клеток (сухой вес биомассы) 1 мл гранул содержит 1,9 и 11 мг клеток соответственно.

**2.2.1. Трансформация стероидов с помощью клеток,
включенных в полиакриламидный гель:
реакция 1,2-дегидрирования**

Стероидные соединения трансформируются клетками, включенными в гель, в реакторах трех типов, показанных на рис. 7-1: в колонке с вытеснением (тип 1), в непрерывно-проточном реакторе с продуванием воздуха (тип 2) и в реакторе с перемешиванием (тип 3).

В реакторах типа 1 и 2 трансформация стероидных соединений идет непрерывно, реактор типа 3 работает в полунепрерывном режиме: в конце трансформации продукт удаляют, носитель с клет-

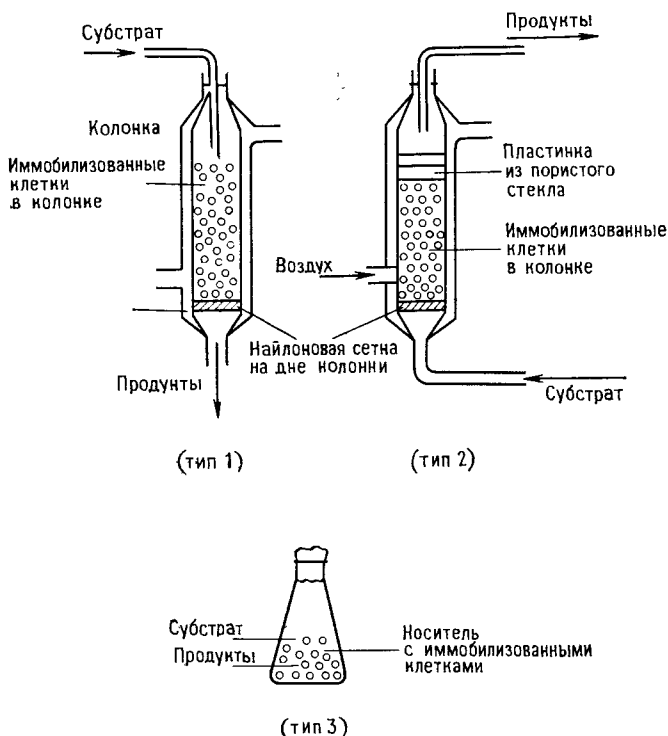


Рис. 7-1. Реакторы для трансформации стероидных соединений.

ками промывают повторно буфером или физиологическим раствором и используют для новых трансформаций. Между трансформациями гранулы хранят в холодильнике ($+4^{\circ}\text{C}$). Для более длительного хранения используют лиофилизацию (до 2—3 мес).

1. Трансформацию проводят в колбах объемом 750 мл на качалке (180—220 об/мин при температуре 29°C). В них вносят 9—18 мл гранул (1 мл гранул содержит 1,9 или 11 мг клеток) и субстрат.
2. Прибавляют 10 мМ фосфатный буфер, pH 7,2, доводя жидкую фазу до 100 мл.
3. Субстрат гидрокортизон добавляют в концентрации 0,2 мг/мл для реакторов типа 1 (концентрация этанола 2%, вес/объем) и 0,2—1,0 мг/мл для реакторов типа 2 (концентрация этанола 2—4%, вес/объем) или в микрокристаллическом состоянии (частицы величиной 10—50 мкм при концентрации 0,5—50 мг/мл) для реакторов типа 3.

Стероиды анализируют методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Периодически отбирают пробы по 2—5 мл, экстрагируют их трижды двойным объемом хлороформа, экстракт упаривают под вакуумом и сухой остаток растворяют в этаноле до концентрации 2 мкг/мкл. 20—40 мкг образца наносят на пластинки силифол UV-254 и разделяют стероиды в системе бензол:ацетон (3:1). Перед использованием пластинки промывают 20—30 мин этанолом и высушивают.

После разделения стероидных соединений, пластинки подсушивают на воздухе, отмечают пятна, поглощающие в УФ-свете, вырезают их вместе с подложкой и помещают в пробирки, содержащие 5 мл этанола. Экстракцию проводят в течение 15 мин при периодическом встряхивании: оптическую плотность элюата измеряют на спектрофотометре при 240 нм.

Количество стероида можно определить также путем сравнения со стандартными образцами. Для этого стандартные образцы, содержащие известное количество стероидов (1—40 мкг), наносят рядом с опытными пробами. Визуальным сравнением образца и опытной пробы (их размеров и интенсивностей поглощения) можно определить количество веществ с точностью 1—2% в области 0,5—2 мкг и с точностью 5—10% в области 10—40 мкг.

Ферментативную активность иммобилизованных клеток в непрерывных и периодических условиях трансформации оценивают по количеству продукта, выраженного в процентах от исходного количества субстрата или в моль/мин.

2.2.2. Влияние условий иммобилизации на Δ^1 -дегидрогеназную активность

При включении клеток в гель в условиях, описанных выше, 3-окостероид- Δ^1 -дегидрогеназная активность остается неизменной.

Таблица 7-3. Влияние условий иммобилизации на жизнеспособность клеток *A. globiformis*

Вариант	Продолжительность, мин	Температура, °C	Удельная активность, мкмоль·мг ⁻¹ клеток·мин ⁻¹	Жизнеспособность, %
1	1—2	4	0,14—0,15	100
2	20	4	0,038	6,4
3	20	26	0,009	0,5

В этом случае специфическая Δ^1 -дегидрогеназная активность иммобилизованных клеток соответствует активности свободных клеток и составляет 0,14 мкмоль·мг⁻¹ клеток·мин⁻¹. Изменение условий иммобилизации, например увеличение температуры, времени образования геля или концентрации полиакриламида, отрицательно влияет на ферментативную активность [21].

Как показано в табл. 7-3, контакт с реагентами, участвующими в полимеризации в течение 20 мин при 4°C (вариант 2), приводит к гибели значительной части клеток. В условиях, описанных в варианте 2, жизнеспособными остаются только 6,4% клеток. Повышение температуры до 26°C при том же времени иммобилизации приводит к снижению количества жизнеспособных клеток до 0,5% от первоначального (вариант 3). Следовательно:

1. 3-окостероид- Δ^1 -дегидрогеназная активность зависит от жизнеспособности иммобилизованных клеток;
2. 3-окостероид- Δ^1 -дегидрогеназная активность максимальна при включении в гель живых клеток за короткое время полимеризации (1—3 мин) при 4°C;
3. Жизнеспособность иммобилизованных клеток зависит от условий иммобилизации.

2.2.3. Многократное проведение процесса 1,2-дегидрирования при помощи иммобилизованных клеток *A. globiformis*

Способность клеток *A. globiformis* в иммобилизованном состоянии осуществлять многократные трансформации гидрокортизона изучали в условиях, описанных в разд. 2.2.1 (реактор типа 3). Использовали 9 мл гранул (17 мг клеток) при концентрации гидрокортизона 1 мг/мл.

При этих условиях трансформации оказалось возможным не только сохранить активность на уровне свободных клеток, но и значительно стабилизировать ее (рис. 7-2, кривая I). Период полужизни Δ^1 -дегидрогеназной активности — 140 дней (160 трансформаций), чистое операционное время — 20 дней.

Падение Δ^1 -дегидрогеназной активности определяется временем, необходимым для полного превращения гидрокортизона в

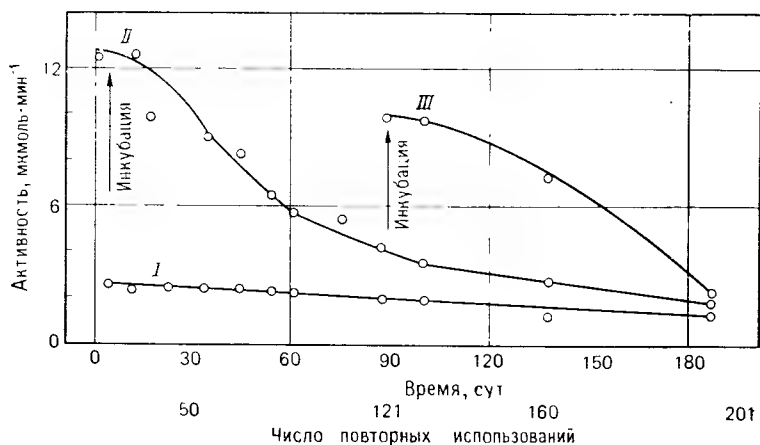


Рис. 7-2. Изменение 3-оксостероид- Δ^1 -дегидрогеназной активности во время повторных трансформаций гидрокортизона в периодических условиях. I — гранулы, не инкубированные в питательной среде; II — гранулы, однократно инкубированные в питательной среде; III — гранулы, инкубированные дважды в питательной среде.

преднизолон. Для проведения первой трансформации требуется 2 ч, за 4 ч проходит 200-я трансформация. Падение активности связано с уменьшением количества жизнеспособных клеток в геле. После 60 трансформаций, проведенных за первый месяц, жизнеспособными оставались 75% клеток. В конце второго месяца количество их снизилось до 35%, а через 6 мес осталось лишь 6% жизнеспособных клеток.

Одновременно с исследованиями ферментативной активности и жизнеспособности клеток в геле мы проводили электронно-микроскопические исследования. Образцы отбирали каждые пять суток в течение первого месяца и затем через каждые две недели. На рис. 7-3, А и Б видно, что гель имеет крупнопористую структуру. Включение в гель не приводит к изменению ультраструктуры клеток *A. globiformis*, однако со временем появляются клетки с измененной ультраструктурой, а в глубине гранул накапливаются лизированные клетки. В приповерхностном слое клетки длительное время сохраняют интактность, более того, их количество несколько увеличивается вследствие размножения их внутри геля. Вероятно, рост происходит за счет продуктов лизиса части клеток, так как процессы трансформации идут в отсутствие питательной среды. В конце данного эксперимента в приповерхностных слоях гранул клетки были в основном интактные, морфологически неизмененные, тогда как в глубине гранул все клетки были лизированы [22].

Логично предположить, что уровень ферментативной активно-

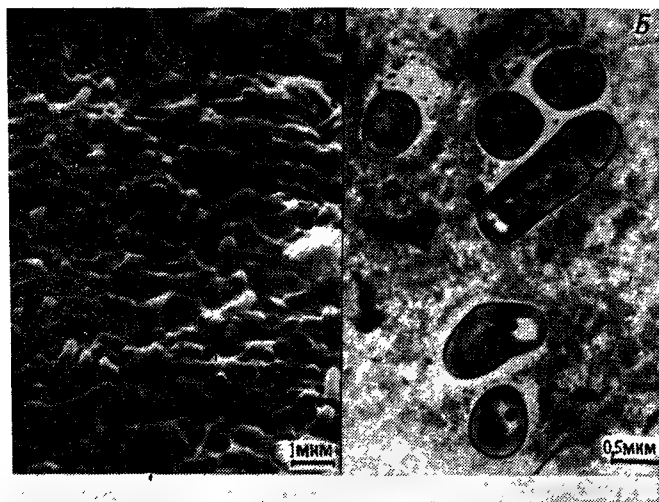


Рис. 7-3. Распределение и ультраструктура клеток в геле. А. Поверхность гранулы. Б. Ультраструктура клеток после иммобилизации.

сти иммобилизованной клеточной системы контролируется изменением интенсивности роста клеток внутри геля. В связи с этим гранулы инкубировали в питательной среде в присутствии индуктора. Мы изучали закономерности размножения клеток внутри геля, распределение клеток и изменение ультраструктуры клеток в ходе многократных трансформаций на буферной среде. Особое внимание мы обращали на взаимосвязь морфофизиологических изменений в клетках и 3-оксостероид- Δ^1 -дегидрогеназной активности.

Гранулы, содержащие клетки, получали в асептических условиях и инкубировали 24 ч в питательной среде в тех же условиях, в которых выращивали свободные клетки. После инкубации гранулы отфильтровывали, промывали стерильным буферным или физиологическим раствором и использовали для дальнейших трансформаций или хранили в холодильнике. На рис. 7-2 (кривая II) видно, что после инкубации в питательной среде активность увеличивается в 5 раз с 2,5 до 12,6 мкмоль·мин⁻¹. При повторных трансформациях в течение двух недель Δ^1 -дегидрогеназная активность сохраняется неизменной, затем начинает снижаться. После 200 трансформаций через 6 мес сохраняется 72% исходной активности. С целью реактивации системы инкубированные гранулы вторично помещали в питательную среду и инкубировали в течение суток. Как следует из рис. 7-2 (кривая III) активность при этом увеличивается более чем в два раза.

Мы изучали также распределение и ультраструктуру клеток в геле после инкубации гранул в питательной среде. После инкуба-

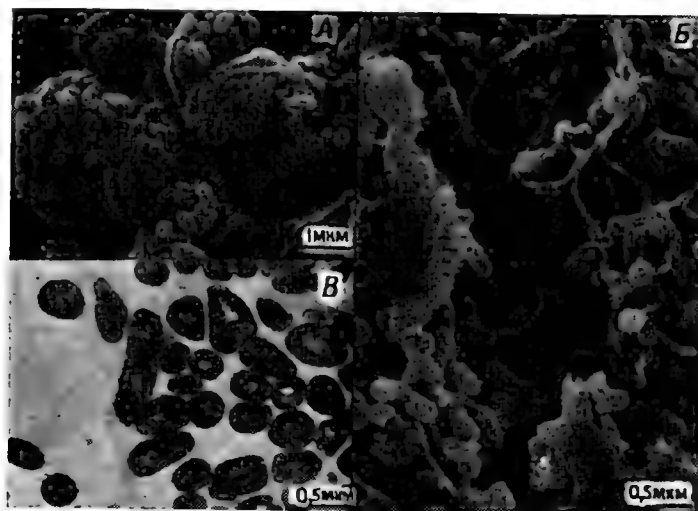


Рис. 7-4. Поверхность гранулы полнакриламидного геля после инкубации в питательной среде. А. Приповерхностные колонии в геле. Б. Колонии внутри гранул. В. Ультраструктура клеток после инкубации в питательной среде.

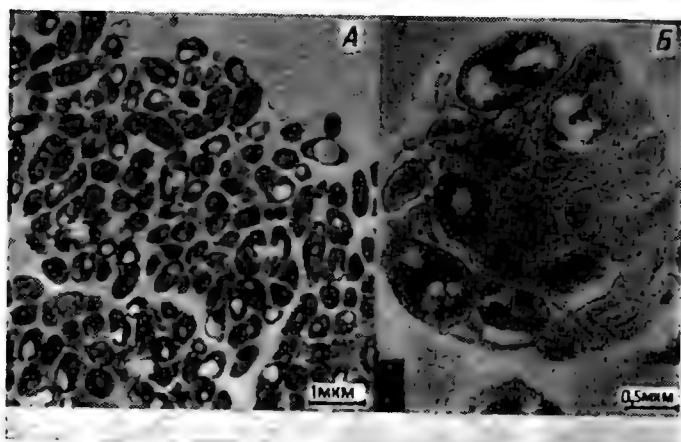


Рис. 7-5. Ультраструктура клеток гранулы геля во время периодических трансформаций. А. Поверхностный слой гранулы через 6 мес. Б. Клетки в глубоких слоях гранул через 3 мес.

ции гранул в полноценной питательной среде в течение суток гель заполняли клетками новой популяции (рис. 7-4, *A—B*). Ультратонкие срезы гранул с клетками показали, что клетки внутри геля морфологически интактны и способны делиться (рис. 7-4, *B*). В ходе последовательных трансформаций в течение 6 мес в приповерхностных слоях геля преобладали интактные клетки (рис. 7-5, *A*).

В более глубоких слоях геля лизис происходил интенсивнее, вероятно, вследствие создания анаэробных условий и недостатка питательных веществ. Ультратонкие срезы средних слоев гранул позволили обнаружить полный лизис клеток через 2—3 мес после иммобилизации (рис. 7-5, *B*). После повторной инкубации гель заполняли клетками новой популяции, которая была более гетерогенной и содержала не только интактные клетки, но также клетки с измененной ультраструктурой и лизированные клетки.

Для поддержания жизнеспособности клеток в геле необходимо периодически между трансформациями в буферной среде повторять инкубации в питательной среде.

2.2.4. Дегидрирование в непрерывных условиях трансформации (реакторы типа 1 и 2)

1. Термостатируемую колонку, имеющую 2 см в диаметре (рис. 7-1), заполняют гранулами, содержащими клетки *A. globiformis* (концентрация клеток 1,9 или 11 мг/мл гранул).
2. Через колонку, заполненную гранулами (18 мл), с помощью перистальтического насоса LKB пропускают раствор гидрокортизона (0,1—0,2 мг/мл) в 10 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,2.

В непрерывных условиях трансформации постоянный градиент субстрата и продукта устанавливается в зависимости от скорости потока субстрата, выражаемого как:

$$SV = \frac{1 \text{ мл раствора}}{1 \text{ мл гранул/ч}} = 1 \text{ ч}^{-1}$$

или в единицах линейной скорости: мл·ч⁻¹

Одним из основных факторов, определяющих селективность этого процесса, является концентрация клеток в носителе. Гранулы, содержащие 0,2—1,9 мг клеток/мл геля, при скорости потока субстрата $SV \geq 2,0 \text{ ч}^{-1}$ селективно осуществляют Δ^1 -дегидрирование гидрокортизона и других стероидов: кортизона, кортексолона, метилтестостерона. При увеличении концентрации клеток в гранулах селективность процесса нарушается: образуются 20 β -гидроксипроизводные [22].

В условиях селективного 1,2-дегидрирования выход дегидро-

аналогов 90—95% при концентрации исходного субстрата не более 0,1 мг/мл. Если концентрация гидрокортизона увеличивается до 0,2 мг/мл, то выход дегидрированного производного значительно снижается. В этом случае образуется лишь 50—60% преднизолона. Клетки, включенные в полиакриламидный гель, образуют подобные количества преднизолона в широких интервалах температур (10—50°C) и pH (6,0—9,0). Свободные и иммобилизованные клетки проявляют максимальную активность при 37°C и pH 7,0—8,0.

Процесс Δ^1 -дегидрирования стабилен при нейтральном и щелочном pH (7,0—9,0) и температуре 20—25°C. Обнаружено, что выход преднизолона остается постоянным при скорости потока 5—300 мл/ч ($SV=0,12\text{—}30,0\text{ ч}^{-1}$). Процесс стабилен при низких скоростях потока. При $SV=1,05\text{—}2,1\text{ ч}^{-1}$ период полужизни клеток, включенных в гель в оптимальных условиях (1—2 мин при 4°C), составляет 25 сут. Изменение условий иммобилизации (повышение температуры и увеличение времени процесса полимеризации) приводит к снижению стабильности Δ^1 -дегидрирования. Период полужизни процесса, осуществляемого клетками, включенными в гель в течение 15 мин при 10—12°C, составляет 6—7 сут [21].

Как уже упоминалось, недостатком процесса дегидрирования в условиях непрерывной трансформации (реактор типа 1) является неполное превращение гидрокортизона в преднизолон, обусловленное недостатком кислорода в реакционной среде. Добавочная аэрация гранул, имеющая место в реакторах типа 2, оказывает положительный эффект. При скорости потока субстрата $2,0\text{ ч}^{-1}$ и продувании воздуха через колонку, обеспечивающем перемешивание гранул, гидрокортизон полностью превращается в преднизолон (концентрация клеток в гранулах 1,9 мг/мл). При этих условиях трансформации можно также использовать микрокристаллический гидрокортизон в концентрации 1 г/мл. В этом случае при скорости потока $4,0\text{ ч}^{-1}$ образуется 55% преднизолона. При пропускании полученного элюата через вторую колонку выход преднизолона достигает 88—90%.

Уменьшение ферментативной активности иммобилизованных клеток, обнаруженное в ходе непрерывной трансформации, сопровождается снижением дыхательной активности и жизнеспособности, а также изменением их ультраструктуры. Как показано с помощью просвечивающей электронной микроскопии, после включения в гель и после первых трансформаций клетки в геле остаются морфологически интактными (рис. 7-3, Б). На пятые сутки на поверхности гранул обнаруживаются микроколонии, содержащие большое количество бактериальных клеток (рис. 7-6, А).

Исследования гранул показали, что размножение клеток происходит не только на поверхности гранул, но и внутри них. В приповерхностных слоях гранул отдельные участки содержат скопле-

ния интактных и делящихся бактерий. Мы полагаем, что рост иммобилизованных клеток обусловлен наличием криптогенного роста в буферной среде. Криптогенный рост на основе продуктов лизиса клеток со временем усиливается, поскольку в ходе многократных трансформаций количество лизированных клеток в популяции иммобилизованных клеток увеличивается. Через 25—30 сут большая часть клеток лизируется (рис. 7-6, Б). Этот период характеризуется также необратимым падением Δ^1 -дегидрогеназной активности.

Чтобы стабилизировать реакцию Δ^1 -дегидрирования в непрерывных условиях трансформации, целесообразно применять гранулы, предварительно инкубированные в питательной среде в присутствии индуктора. Периодическая инкубация гранул позволяет также поддерживать жизнеспособность популяции клеток в геле с высокой Δ^1 -дегидрогеназной активностью.



Рис. 7-6. Ультраструктура и распределение клеток в геле во время непрерывной трансформации. А. Образование микроколоний на поверхности геля (5 сут). Б. Лизис клеток в геле (25—30 сут).

2.3. Включение в альгинат кальция

Иммобилизацию клеток *A. globiformis* в 2%-ном (вес/объем) альгинате кальция проводят стандартным методом [23] (см. также гл. 3).

1. Смешать 100 мг клеток и 6 мл физиологического раствора с 14 мл 3%-ного альгината натрия (вес/объем).
2. Добавить полученную смесь по каплям, используя шприц с иглой, в перемешиваемый раствор 10 мМ хлорида кальция.
3. Промыть полученные гранулы или волокна физиологическим раствором и использовать для трансформации.

Установлено, что скорость трансформации гидрокортизона клетками *A. globiformis*, включенными в альгинат кальция, определяется в значительной степени формой носителя и величиной гранул. Наибольшая скорость характерна для носителя в форме волокон (диаметр волокна 1 мм). Скорость трансформации с помощью гранул диаметром 4—5 мм на 30—40% ниже. Одним из

факторов, определяющих низкую активность клеток в этом геле, является, видимо, ограниченная скорость диффузии субстрата в гель. Специфическая Δ^1 -дегидрогеназная активность клеток, включенных в волокна из альгината кальция, соответствует активности свободных клеток и составляет $0,14 \text{ мкмоль} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ клеток} \cdot \text{мин}^{-1}$.

2.4. Включение в κ -каррагинан

Иммобилизацию клеток *A. globiformis* в 4%-ном (вес/объем) каррагинане проводили по следующей методике.

1. Смешать 0,8 г сухого порошка κ -каррагинана с 17 мл 0,9%-ного (вес/объем) NaCl и автоклавировать смесь при 112°C в течение 30 мин.
2. Охладить расплавленный каррагинан до $45\text{--}50^\circ\text{C}$ и быстро смешать с 3 мл 0,9%-ного (вес/объем) NaCl, содержащего 100 мг клеток (сухой вес).
3. Ввести полученную смесь по каплям, используя шприц, в перемешиваемый охлажденный 0,3 М KCl, чтобы получить гранулы величиной 3—4 мм в диаметре.
4. Для получения мембран разлить каррагинан с клетками в чашки Петри и затем разрезать мембраны на кусочки.
5. Хранить иммобилизованные клетки при 4°C в течение 15 ч в 0,3 М KCl и затем использовать их для трансформации гидрокортизона в преднизолон.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ферментативная активность клеток, включенных в этот носитель, ниже активности свободных клеток. Когда клетки включают в гранулы диаметром 4 мм, Δ^1 -дегидрогеназная активность снижается на 60%. Установлено, что основным фактором, определяющим снижение ферментативной активности при включении в каррагинан, является высокая температура ($45\text{--}50^\circ\text{C}$) и продолжительность ее воздействия.

Повышение Δ^1 -дегидрогеназной активности может быть достигнуто при модификации указанного метода.

1. Внести 10 мл расплавленного каррагинана (0,8 г) в 20 мл 0,9%-ного (вес/объем) NaCl в чашку Петри.
2. После образования геля нанести на поверхность геля концентрированную суспензию клеток [100 мг (сухой вес) в 0,8 мл 10 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7,2], содержащую 0,17 мл этанола и 1,2 мг гидрокортизона.
3. Подсушить суспензию клеток на воздухе в течение 15—20 мин.
4. Нанести на поверхность геля 10 мл расплавленного каррагинана, охлажденного до $45\text{--}50^\circ\text{C}$, после чего клетки оказываются между двумя гелевыми мембранами.
5. Хранить мембраны 15 ч в 0,9 М KCl при 4°C и затем использовать для трансформации.

При таком изменении техники иммобилизации уменьшается продолжительность температурного воздействия на клетки. Удельная Δ^1 -дегидрогеназная активность клеток при этом равна $0,11 \text{ мкмоль} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ клеток} \cdot \text{мин}^{-1}$, что составляет 78% активности свободных клеток. Ферментативная активность клеток, включенных в каррагинан в присутствии субстрата, на 10—15% выше, чем без него.

Однако в периодических условиях трансформации активность не стабильна, период полужизни фермента составляет 10 сут. Мы полагаем, что это обусловлено не только температурным воздействием, но и вымыванием клеток из носителя. Обработка носителя с клетками глутаровым альдегидом — даже в течение 2—3 мин — ингибирует активность почти полностью.

2.5. Включение в мембрану из поливинилового спирта и другие синтетические мембраны

Для иммобилизации клеток использовали также поливиниловый спирт (ПВС), диацетат- и триацетатцеллюлозу, полистирен и полиакрилонитрил.

1. Приготовить 10%-ный (вес/объем) раствор ПВС на дистиллированной воде, нагреть до его полного растворения и затем охладить до комнатной температуры.
2. Добавить 10 мл раствора ПВС к суспензии клеток *A. globiformis* в воде (16—32 мг/мл), полученную смесь тщательно перемешать и вылить в чашку Петри (диаметр 10,5 см).
3. Раствор ПВС с клетками облучить УФ-светом (лампа PRK — 2 м) в течение 15—90 мин.
4. После высушивания мембрану разрезать на кусочки площадью 100—200 мм² и промыть их 1—2 ч проточной водопроводной водой.
5. Трансформацию проводить в колбах Эрленмейера на 250 мл, содержащих 25 мл реакционной среды при концентрации гидрокортизона 1 мг/мл.

При введении клеток в другие названные носители последние растворяют в подходящем органическом растворе (бензоле, ацетоне и т. д.), смешивают с клетками и высушивают на воздухе. Полученные мембраны фрагментируют и используют для трансформации. Установлено, что Δ^1 -дегидрогеназная активность сохраняется только после включения в мембраны из поливинилового спирта. Активность иммобилизованной системы повышается с увеличением биомассы в мембранах. При концентрации клеток 8—16 мг/мл наряду с Δ^1 -дегидрированием происходит 20β -восстановление и в среде накапливается 20β -гидроксипроизводное преднизолона. Деструкции стероидов не обнаружено.

2.6. Включение в фотосшитые полимеры

Клетки *A. globiformis* были включены в фотосшитые полимеры по следующей методике [24].

1. Расплавить полиэтиленгликольметакрилат (0,5 г) при 40 °С.
2. Смешать ENT-101 (0,5 г) без нагревания с 0,04—0,2 г клеток (сухой вес биомассы) в 1,5 мл 10 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7,2.
3. Перемешать все компоненты, добавить 5 мг кристаллического этилового эфира бензойной кислоты и снова перемешать.
4. Равномерно распределить гомогенную суспензию на кварцевом стекле; при этом область распределения ограничить кольцом из нержавеющей стали (диаметр 60 мм, высота стенки 0,5 мм).
5. Накрывать суспензию целлофановой пленкой, удалив пузырьки воздуха, и прижать ее стеклом.
6. Облучить суспензию УФ-светом.
7. Разрезать пластинку на квадраты (5×5 мм), промыть водопроводной водой или буферным раствором и использовать для трансформации после 3—5-минутной полимеризации.

Примечание: расстояние между источником УФ-света и кварцевым стеклом 200 мм; важно, чтобы в ходе облучения и последующей полимеризации (3—5 мин) стекло не перегревалось.

Изучение жизнеспособности иммобилизованных таким образом клеток показало, что после выделения из полимера они образуют колонии на твердой среде, а после инкубации в питательной среде растут внутри геля (данные просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии). Живые иммобилизованные в фотосшитых полимерах клетки *A. globiformis* осуществляют процесс Δ^1 -де-

Таблица 7-4. Трансформация гидрокортизона клетками *A. globiformis* 193, включенными в фотосшитые полимеры

Условия		Продукты трансформации, %					
иммобилизованные клетки, мг/мл	гидрокортизон, мг/мл	через 2 ч			через 20 ч		
		F ¹	Δ F ²	20 β Δ F ³	F	Δ F	20 β Δ F
0,1	0,2	5	85	5	—	50	50
0,1	1,0	60	40	—	10	90	—
0,02	0,2	40	60	—	—	80	20
0,04	1,0	60	40	—	—	80	10

¹ F — гидрокортизон.

² Δ F — преднизолон.

³ 20 β Δ F — 20 β -гидроксипроизводное преднизолона.

гидрирования в периодических условиях трансформации (табл. 7-4).

При определенных соотношениях субстрат:биомасса можно получить преднизолон без примеси 20β -гидроксипроизводных. Ферментативная активность мембран довольно стабильна: через 3 нед хранения мембран при 4°C она не изменяется. В периодических условиях трансформации период полужизни Δ^1 -дегидрогеназы составляет 30 сут (операционная стабильность 20 сут). Время, необходимое для 90%-ной трансформации гидрокортизона, увеличивается при этом с 2 до 48 ч. При инкубации мембран с клетками в питательной среде в присутствии индуктора активность иммобилизованной системы увеличивается почти в два раза и значительно стабилизируется. Увеличение активности обусловлено ростом клеток в приповерхностных слоях геля.

2.7. Включение в агаровый гель и в белковые мембраны

2.7.1. Агаровый гель

1. Смешать суспензию клеток (100 мг/мл буфера) с 3%-ным агар-агаром, нагретым до $45-50^\circ\text{C}$.
2. Охладить гель до 20°C и полученный блок фрагментировать на гранулы, продавливая его через сито (20—30 меш).
3. Промыть гранулы 10 мМ Na-фосфатным буфером, pH 7,2, и использовать их для трансформации в непрерывных и периодических условиях.

2.7.2. Белковые мембраны

1. Растворить 75 мг сывороточного альбумина и 0,12 г диальдегида крахмала в 6 мл 10 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7,2.
2. Добавить к раствору клетки *A. globiformis* (25 мг), размешать, разлить в чашки Петри и высушить при 4°C .
3. Разрезать мембраны, промыть буферным раствором и использовать для трансформации.

Удельная Δ^1 -дегидрогеназная активность клеток *A. globiformis* в данном носителе равна активности свободных клеток и составляет $0,14 \text{ мкмоль} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ клеток} \cdot \text{мин}^{-1}$.

2.8. Адсорбция

Адсорбция — один из наиболее старых и простых методов иммобилизации клеток микроорганизмов (гл. 1). Этот метод исключает использование токсичных соединений и делает возможным сохранение жизнеспособности клеток. Однако он имеет и серьезные недостатки, к которым относятся незначительная прочность

Таблица 7-5. Основные структурные характеристики носителей, количество и активность адсорбированных клеток *A. globiformis* 193

Носитель	Характеристика носителя						Количество иммобилизо- ванных кле- ток, мг/г	Активность	
	соли/ка- олин, г/г	объемная масса, г/см ³	объем пор, см ³ /г	удельная поверх- ность, м ² /г	средний диаметр пор, мкм	размер Гранул, мм		мкмоль× · мин ⁻¹ · мг ⁻¹ × мин ⁻¹ · мг ⁻¹ носителя	мкмоль× · мин ⁻¹ · мг ⁻¹ · клеток ⁻¹
CC-1	1,25	0,69	0,55	1,2	1,8	1—2	4,0	0,55	0,138
CC-1						0,5—1	4,6	0,62	0,135
CC-1						0,25—0,5	4,6	0,69	0,15
CC-2	2,3	0,49	0,92	0,6	6	0,5—1	10,8	1,4	0,138
CC-3	3,3	0,35	1,5	0,5	12	1—2	10	1,42	0,142
CC-3						0,5—1	10,2	1,28	0,126
CC-4	3,32	0,37	1,39	0,5	11	1—2	9,9	1,39	0,140
CC-4						0,5—1	10	1,39	0,139
CC-4						0,25—0,5	11	1,51	0,137
CC-5	3,33	0,35	1,47	1,8	3,3	1—0,5	10,8	1,48	0,137
CC-5						0,25—0,5	11	1,54	0,140
CC-6	3,36	0,34	1,51	1,6	3,8	0,5—1	10,2	1,40	0,137
Сферохром-2PG	—	0,49	1,93	0,9	4,0	0,25—0,3	7,4	1,03	0,139

удерживания клеток и недостаточное количество биомассы на единицу носителя.

2.8.1. Адсорбция на целлюлозе

Для иммобилизации клеток *A. globiformis* используют различные типы целлюлоз и крупнопористую керамику (табл. 7-5). Клетки иммобилизуют по следующей методике.

1. Добавить к суспензии целлюлозы в буфере (7 г в 150—20 мл) бактериальную суспензию (100 мг клеток в 5—10 мл).
2. Перемешать на качалке (200 об/мин) в течение 20—30 мин при 20—22 °C и оставить на ночь в холодильнике при 4 °C.
3. Отделить свободные клетки декапацией носителя 10 раз в 10 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,2, или центрифугированием носителя с клетками в течение 15 мин при 1500 g с последующим промыванием буфером.

В случае непрерывной трансформации свободные клетки могут быть удалены промыванием на колонке. Окончание промывки и десорбции клеток определяют по оптической плотности элюата. При адсорбции 14—16 мг клеток на 1 г носителя прочно удерживается 6 мг/г носителя. Адсорбированные таким образом клетки используют для трансформации в периодических и непрерывных условиях.

В периодических условиях трансформации суспензию помещают в колбу на 750 мл, содержащую 200 мл буферного раствора и субстрат. После каждого эксперимента носитель промывают водой или буфером 3—4 раза и до следующего использования хранят при 4 °C.

Для непрерывной трансформации 7 г носителя с клетками помещают в колонку (2×18 см), через которую пропускают раствор гидрокортизона (0,2 мг/мл в 10 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,2).

Клетки *A. globiformis*, адсорбированные на целлюлозе, способны осуществлять трансформацию стероидов.

В периодических условиях скорость окисления гидрокортизона адсорбированными клетками такая же, как у свободных клеток — 0,11—0,12 мкмоль·мг⁻¹ клеток·мин⁻¹. Степень потребления кислорода адсорбированными и свободными клетками в ходе окисления гидрокортизона одна и та же: 50—65 нмоль O₂·мг⁻¹ клеток·мин⁻¹. Активность клеток во время адсорбции на целлюлозе не изменяется [17].

В отсутствие гидрокортизона, когда дыхание клеток определяется только эндогенными субстратами, концентрация кислорода снижается линейно по высоте колонки. Следовательно, скорость потребления кислорода при различных скоростях потока (6—570 мл/ч, SV=0,5—51,2 ч⁻¹) не зависит от его концентрации в

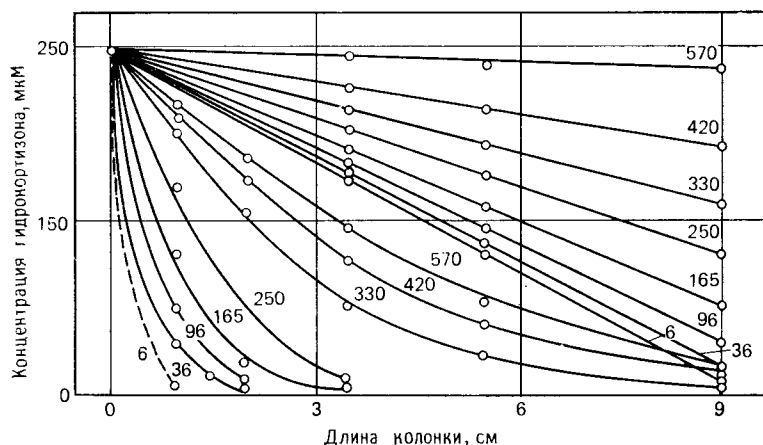


Рис. 7-7. Профили концентраций кислорода во время эндогенного дыхания и при дегидрировании гидрокортизона адсорбированными клетками *A. globiformis* в колонке (диаметр 2 см) при различных скоростях протока субстрата (скорости обозначены на рисунке цифрами, мл/ч).

среде в пределах 8—250 мкМ. Когда в реакционную среду вводят гидрокортизон, скорость потребления кислорода увеличивается (рис. 7-7, 7-8).

Потребление кислорода клетками измеряют полярографически (полярограф LP-7, Чехословакия), используя платиновые электроды Кларка. Концентрация кислорода в среде равна 250 мкМ. Измерения проводят при 22—25 °С в 10 мМ трис-фосфатном

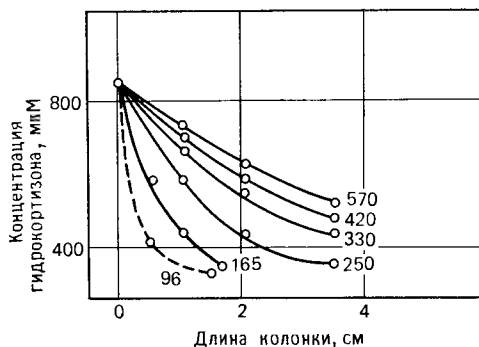


Рис. 7-8. Профили концентраций гидрокортизона при его окислении адсорбированными клетками *A. globiformis* в колонке (диаметр 2 см) при различных скоростях протока (скорости обозначены на рисунке цифрами, мл/ч).

буфере, pH 7; конечный объем образца 2 мл. Для определения концентрации кислорода в колонке используют проточную кювету объемом 0,5 мл.

Анализ экспериментальных данных свидетельствует о том, что основным фактором, обеспечивающим эффективное использование иммобилизованных клеток в непрерывных условиях, при получении преднизолон является наличие кислорода в системе.

Оптимальное соотношение гидрокортизон : кислород в растворе (2 : 1), обеспечивающее полное превращение субстрата, достигается при скорости потока 200—240 мл/ч ($SV=19,0$, pH 7,2, $T=20^{\circ}\text{C}$, колонка $2 \times 3,5$ см содержит 21 мг клеток, 3,5 г целлюлозы; гидрокортизон 0,18 мг/мл). Период полужизни фермента 12 сут при $SV=1,6 \text{ ч}^{-1}$.

Количественное превращение растворенного гидрокортизона в преднизолон возможно при более низких скоростях потока и добавочной аэрации (реактор типа 2). В хорошо аэрируемом реакторе с перемешиванием возможна полная трансформация гидрокортизона в концентрации 0,5—1,0 мг/мл (17).

2.8.2. Адсорбция на крупнопористой керамике

Использование клеток, иммобилизованных на твердом керамическом носителе, представляется перспективным. Благодаря сохранению в различных условиях (давление, высокие скорости потока) величины пор и структуры микроорганизмы оказываются хорошо защищенными от внешних воздействий. Керамический носитель обладает высокой термостабильностью (1000°C), которая делает возможной его регенерацию.

В табл. 7-5 приведены данные по адсорбции клеток *A. globiformis* в зависимости от удельной поверхности и величины пор керамики.

Образцы керамики СС-2, СС-3 и СС-4 со средним диаметром пор $d_a \geq 6$ мкм имеют сходную удельную поверхность ($S=0,5—0,6 \text{ м}^2/\text{г}$) и адсорбируют равное количество клеток. В образцах с меньшим размером пор (СС-5 и СС-6) сорбирующая поверхность в три раза больше, но количество клеток, адсорбированных на поверхности, остается тем же.

Даже при самой малой величине пор (СС-1) обнаружено резкое уменьшение количества адсорбированных клеток, несмотря на то что поверхность этих образцов в два раза больше, чем у крупнопористых носителей. Следовательно, не вся поверхность образцов СС-5, СС-6 и СС-1 доступна для клеток.

Удельная активность иммобилизованных клеток во всех образцах практически одна и та же и не отличается от удельной активности свободных клеток, что свидетельствует об отсутствии диффузионных затруднений для доступа субстрата к клеткам.

Клетки *A. globiformis*, иммобилизованные на керамическом носителе, могут быть использованы для повторных трансформаций гидрокортизона. Клетки сохраняют свою активность после 31 трансформации (чистое операционное время 15 сут). В течение этого времени начальная скорость трансформации остается постоянной $1,4 \text{ мкмоль} \cdot \text{г}^{-1} \text{ носителя} \cdot \text{мин}^{-1}$ ($0,14 \text{ мкмоль} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ клеток} \cdot \text{мин}^{-1}$). После 38 трансформаций (операционное время 19 сут) начальная скорость снижается и время полного превращения субстрата увеличивается до 14 ч, а после 50 трансформаций — до 24 ч.

Активность клеток, иммобилизованных на других носителях, изменяется сходным образом. Менее стабильны процессы, катализируемые клетками, адсорбированными на сферохроме. Такие клетки теряют активность после 20 трансформаций.

Когда клетки иммобилизованы на носителе СС-3 (фракция 0,5—1,0 мм), в непрерывных условиях трансформации процесс более стабилен. При пропускании раствора гидрокортизона (0,2 г/л) через колонку ($2 \times 1,5 \text{ см}$) со скоростью потока 50 мл/ч 50%-ный выход преднизолонa сохраняется в течение 10 сут (период полужизни 12 сут). При использовании носителя СС-1 (фракция 0,5—1 мм) период полужизни клеток 6 сут. Различная стабильность обусловлена различиями структуры поверхности и величины пор образцов, поскольку эти факторы влияют на силу удержания клеток на носителе.

Уменьшение активности клеток, адсорбированных на носителе, может быть также следствием лизиса клеток, однако мы не исследовали морфологии клеток в этих опытах.

Весьма важной представляется возможность увеличения адсорбции клеток после ряда трансформаций при инкубации носителя с клетками в питательной среде. В результате такой инкубации после сорока трансформаций носитель с клетками обладает почти той же активностью, что и сразу после иммобилизации. Определение количества белка в носителе после инкубации показало, что количество клеток также достигает исходного значения.

2.9. Ковалентное связывание

При ковалентном связывании клеток *A. globiformis* в качестве носителя использовали силикагель (40—100 мкм), который активировали хлоридами хрома и титана (CrCl_3 и TiCl_3 , гл. 2).

Клетки *A. globiformis* иммобилизовали следующим образом.

1. Для активации солями трехвалентного хрома 2,5 г силикагеля суспендировали в 10 мл раствора CrCl_3 различной концентрации (30—45 mM) и добавляли суспензию клеток, содержащую 40 мг клеток/г носителя в 5 мл буфера (общий объем в каждом случае 15 мл).
2. После выдерживания в течение 10 мин при комнатной тем-

пературе носитель, содержащий клетки, промывали 10 мМ Na-фосфатным буфером, pH 7,2.

Количество клеток на сорбенте определяли по разнице количества клеток в суспензии и промывных водах. Клетки могут быть привязаны к носителю и после активации солями $TiCl_3$. Однако при этом не исключена инаktivация клеток, поскольку раствор Ti (III) в соляной кислоте имеет низкое значение pH. После активации хлоридом титана носитель необходимо тщательно отмыть дистиллированной водой.

Удельная 3-окостероид- Δ^1 -дегидрогеназная активность клеток, иммобилизованных на активированном $CrCl_3$ силикагеле, соответствует активности свободных клеток. Как показали исследования с помощью микроскопии, в ходе повторных периодических трансформаций происходит постепенное вымывание клеток с активированного носителя.

2.10. Сравнительная характеристика методов иммобилизации

Известно много методов для иммобилизации клеток *A. globiformis*, обладающих 3-окостероид- Δ^1 -дегидрогеназной активностью: включение в различные гели, например в полиакриламидный гель, каррагинан, альгинатный гель, агар, в мембраны из поливинилового спирта или фоточувствительных полимеров, в белковые мембраны, спитые диальдегидом крахмала; адсорбция на различных целлюлозах и крупнопористой керамике; ковалентное связывание с активированным силикагелем (табл. 7-6 и 7-7).

Таблица 7-6. Сравнительная характеристика 3-окостероид- Δ^1 -дегидрогеназной активности клеток *A. globiformis* 193, иммобилизованных различными способами, в непрерывных условиях

Метод иммобилизации	SV, ч-1	Период полужизни, сут
Включение в		
полиакриламидный гель	2,0	2,5
κ-каррагинан	—	—
Ca-альгинат	—	—
Агаровый гель	1,7	14
Мембраны из		
поливинилового спирта	1,0	12
фотосшитого полимера	—	—
белка, спитого диальдегидом крахмала	—	—
Адсорбция на		
порошковой целлюлозе	1,6	12
ДЭАЭ-целлюлозе	1,6	15
целлюлозе	1,6	10
керамическом носителе, фракция СС-3, 0,5—1,0 мм	5,3	22
Свободные клетки	1,4	6

Таблица 7-7. Трансформация гидрокортизона клетками *A. globiformis*, иммобилизованными различными способами, в периодических условиях

Метод иммобилизации	Удельная активность, $\mu\text{кмоль} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{клеток} \cdot \text{мин}^{-1}$	Количество повторных трансформаций	Остаточная активность, % от исходной
<i>Включение в</i>			
полиакриламидный гель	0,14	200	44 после 6 мес
κ-каррагинан	0,055	10	50 после 10 сут
Са-альгинат	0,14	30	53 после 30 сут
агаровый гель	0,16		
мембраны из поливинилового спирта		7	50 после 7 сут
мембраны из фотосшитых полимеров	0,14	20	30 через 2 мес ¹
мембраны из белка	0,14		
<i>Адсорбция на</i>			
порошковой целлюлозе	0,14—0,16		
целлюлозе	0,16		
ДЭАЭ-целлюлозе	0,16		
керамическом носителе, фракция СС-3, 0,5—1,0 мм	0,15	50	40 после 50 сут
<i>Ковалентное связывание на активированном силикагеле</i>	0,16	2	50 после 3 сут
<i>Свободные клетки</i>	0,16		
¹ Концентрация гидрокортизона 0,2 г/л.			

Многие из этих методов подверглись модификации с целью сохранения активности и жизнеспособности клеток в ходе иммобилизации. В табл. 7-6 дана сравнительная характеристика Δ^1 -дегидрогеназной активности иммобилизованных клеток в непрерывных условиях трансформации. Максимальная стабильность наблюдается у клеток, включенных в полиакриламидный гель и адсорбированных на керамическом носителе. В периодических условиях трансформации хорошие результаты были также получены с клетками, включенными в полиакриламидный гель (период полужизни 5 мес, 160 трансформаций), т. е. из всех изученных методов в настоящее время включение в полиакриламидный гель является наилучшим.

Другой перспективный метод иммобилизации клеток *A. globiformis* — это адсорбция на крупнопористой керамике. В данном случае стабильность системы несколько ниже, чем при включении в полиакриламидный гель, но значительно выше по сравнению с системами, в которые входят другие носители. Следует отметить, что при включении клеток во все носители, кроме каррагинана, дегидрогеназная активность сохраняется на уровне активности свободных клеток, причем клетки в иммобилизованном состоянии остаются жизнеспособными.

3. Другие процессы трансформации стероидных соединений

3.1. Δ^1 -Восстановление

Хорошо известно, что в анаэробных условиях при низком восстановительном потенциале свободные клетки *A. globiformis* осуществляют Δ^1 -восстановление. Предполагают, что процессы Δ^1 -дегидрирования и Δ^1 -восстановления катализируются разными ферментами [25]. После иммобилизации на различных носителях при трансформации в непрерывных условиях (реактор типа 1) клетки сохраняют способность к Δ^1 -восстановлению.

Чтобы изучить условия процесса Δ^1 -восстановления, мы использовали в качестве субстратов преднизолон и 20 β -гидроксипроизводное преднизолона в концентрации 0,2 мг/мл. Стероиды растворяли в этаноле и вносили в 10 мМ Na-фосфатный буфер (концентрация этанола 2%). Конечным продуктом трансформации этих субстратов является 20 β -гидроксипроизводное гидрокортизона.

Данные, характеризующие Δ^1 -гидрирование преднизолона, представлены на рис. 7-9. 3-Оксостероид- Δ^1 -редуктазную активность исследовали при низкой (1,9 мг/мл гранул) и высокой (11 мг/мл гранул) концентрации клеток. При биомассе 1,9 мг/мл гранул ($SV=0,26 \text{ ч}^{-1}$) в течение первых суток трансформации образуется 50% гидрокортизона. На вторые сутки выход гидрокортизона уменьшается до 20%; другие продукты трансформации отсутствуют (рис. 7-9, кривая I). Следовательно, при низкой концентрации клеток Δ^1 -редуктазная активность невысока и процесс Δ^1 -дегидрирования практически не происходит.

При такой же скорости потока субстрата и биомассе 11 мг/мл гранул конечным и единственным продуктом непрерывной транс-

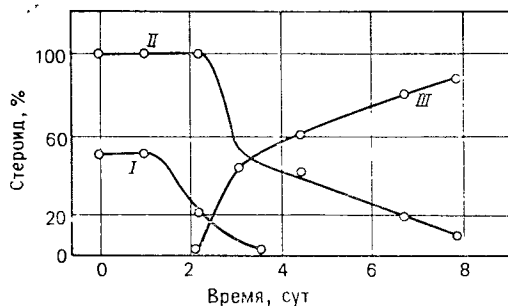


Рис. 7-9. Влияние количества включенных клеток на гидрирование преднизолона ($SV=0,26 \text{ ч}^{-1}$). I — гидрокортизон (биомасса 1,9 мг/мл гранул); II — 20 β -гидроксипроизводное гидрокортизона (биомасса 1,9 мг/мл гранул); III — гидрокортизон (биомасса 11 мг/мл гранул).

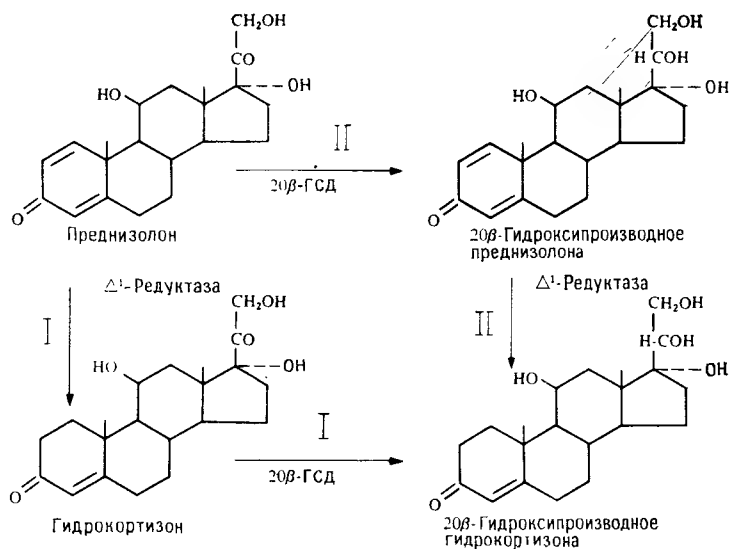


Схема 7-2. Трансформация преднизолона в 20β-гидроксипроизводное гидрокортизона.

формации в течение двух суток (рис. 7-9, кривая *II*) является 20β-гидроксипроизводное гидрокортизона. В дальнейшем выход этого соединения уменьшается и соответственно возрастает выход гидрокортизона (рис. 7-9, кривая *III*).

Подобные результаты получены для клеток *A. globiformis* и при иммобилизации на других носителях. Они свидетельствуют о том, что образование 20β-гидроксипроизводного преднизолона происходит при последовательном действии двух ферментов: 20β-гидроксистероид-дегидрогеназы (20β-ГСД) и Δ¹-редуктазы, причем Δ¹-редуктаза более стабильна и активна, чем 20β-ГСД (схема 7-2).

Во время непрерывной трансформации 20β-гидроксипроизводное гидрокортизона образуется иммобилизованными клетками двумя путями. Δ¹-Редуктазная активность проявляется при различных скоростях протока. Процесс Δ¹-восстановления более стабилен при высокой концентрации клеток в носителе, низких скоростях протока, температуре 20 °C и pH 7,0. Температурный и pH-оптимумы Δ¹-редуктазы свободных и иммобилизованных клеток одинаковы.

3.2. 20β-Восстановление

Стероидные субстраты восстанавливаются в 20-м положении под действием 20β-ГСД *A. globiformis*.

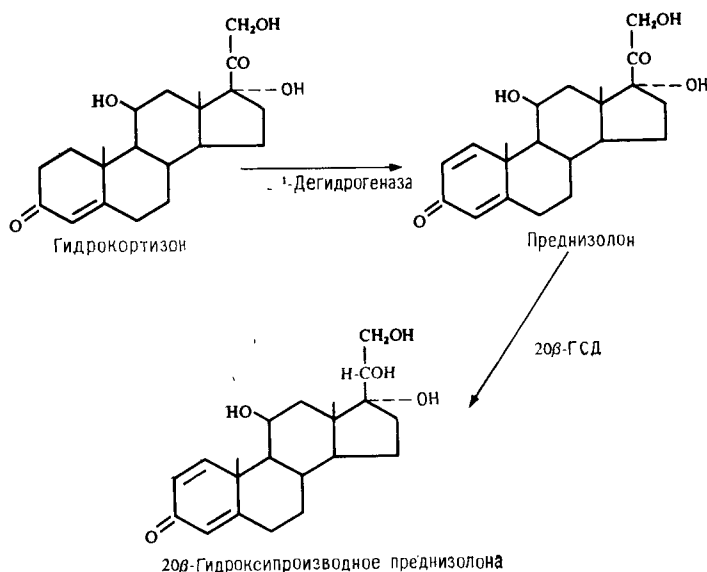


Схема 7-3. Трансформация гидрокортизона в 20β-гидроксипроизводное преднизолона.

После иммобилизации культуры на различных носителях активность 20β-ГСД не изменяется. 20β-Восстановление происходит селективно или наряду с другими реакциями в зависимости от условий аэрации.

3.2.1. Периодические трансформации

Показано, что 20β-гидроксипроизводное преднизолона — конечный, но не единственный продукт трансформации гидрокортизона и преднизолона иммобилизованными клетками. Образованию 20β-гидроксипроизводного предшествует реакция Δ^1 -дегидрирования и накопление преднизолона в среде. Процесс трансформации представлен на схеме 7-3.

Скорость накопления 20β-гидроксипроизводного преднизолона определяется концентрацией клеток в носителе; она одинакова при трансформации преднизолона и гидрокортизона. Отсюда следует, что в аэробных условиях Δ^1 -дегидрирование не является лимитирующей стадией [17].

Исследование свободных клеток показывает, что 20β-восстановление стимулируется в присутствии глюкозы. Трансформацию стероидов свободными клетками в аэробных условиях проводили по следующей методике.

1. Инкубировать 25 мг клеток и гидрокортизон или преднизолон

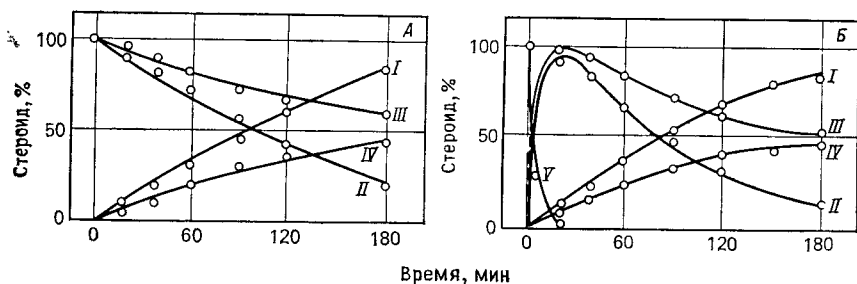


Рис. 7-10. Влияние глюкозы на трансформацию преднизолонa (А) и гидрокортизона (Б) клетками *A. globiformis* 193. I, III — преднизолон; II, IV — 20 β -восстановленное производное преднизолонa; V — гидрокортизон; IV — трансформация в присутствии глюкозы, II — трансформация в отсутствие глюкозы.

лон при концентрации 0,2 мг/мл (0,55 мМ) в 250-миллилитровых колбах, содержащих 25 мл фосфатного буфера, в аэробных условиях на качалке при 180—220 об/мин.

2. Добавить глюкозу до концентрации 1% (вес/объем).

Через 3 ч трансформации преднизолонa в присутствии глюкозы содержание 20 β -гидроксипроизводного достигает 85—90% исходного количества преднизолонa, т. е. в 2—2,5 раза больше, чем в отсутствие глюкозы (рис. 7-10, А, Б). Увеличение 20 β -ГСД активности в присутствии глюкозы, вероятно, обусловлено активацией метаболических путей, которые связаны с увеличением уровня восстановленного NAD, являющегося кофактором 20 β -ГСД [17].

3.2.2. Непрерывные трансформации

При непрерывном протоке субстрата (реактор типа 1) иммобилизованные клетки трансформируют различные стероидные гормоны прегнановой серии (табл. 7-8), образуя их 20 β -гидрокси-

Таблица 7-8. 20 β -Восстановление стероидов, включенных в полиакриламидный гель, в непрерывных условиях

Субстрат	Концентрация стероида, мг/мл	20 β -Гидроксипроизводное	
		через 3 ч	через 20 ч
Гидрокортизон	0,2	100	100
Кортизон	0,2	100	100
Кортексогон	0,2	75	50
Преднизолон	0,2	100	100
Преднизон	0,1	100	—
Δ^1 -Производное кортексогона	0,05	75	40

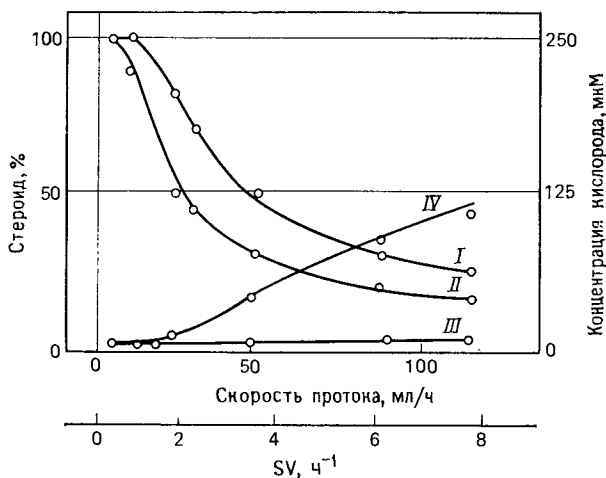


Рис. 7-11. Влияние скорости потока субстрата на образование 20β-гидроксипроизводного и потребление кислорода клетками *A. globiformis*, адсорбированными на целлюлозе (колонка 21×6 см, содержание клеток 6 мг/г целлюлозы). I — в качестве субстрата гидрокортизон, II — в качестве субстрата преднизолон, III — концентрация кислорода в среде при трансформации гидрокортизона, IV — концентрация кислорода в среде при трансформации преднизолона.

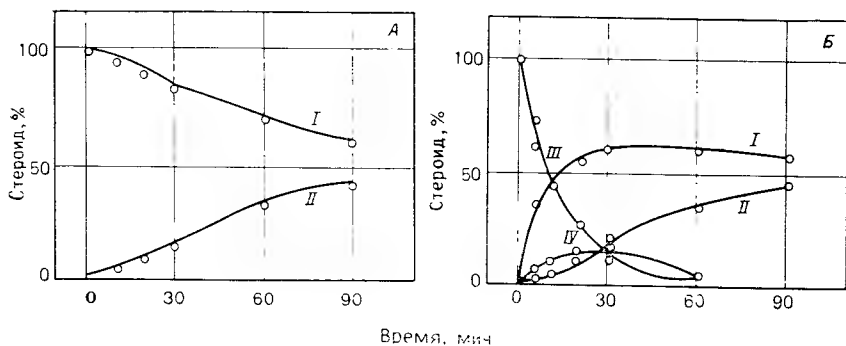


Рис. 7-12. Трансформация гидрокортизона (А) и преднизолона (Б) клетками *A. globiformis* в строго анаэробных условиях. I — гидрокортизон, II — 20β-гидроксипроизводное гидрокортизона; III — преднизолон; IV — 20β-гидроксипроизводное преднизолона.

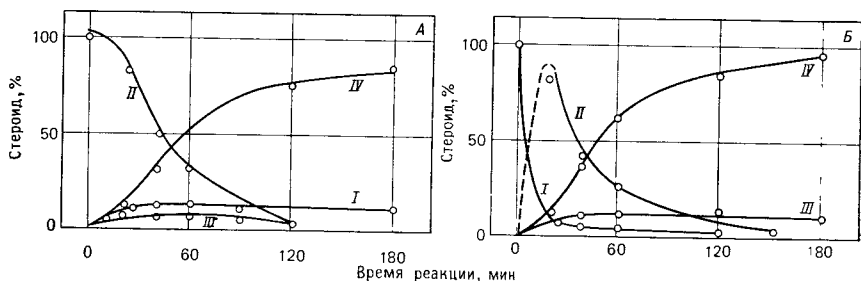


Рис. 1-13. Трансформация гидрокортизона (А) и преднизолона (Б) клетками *A. globiformis* в аэробных условиях в присутствии цианида. I — преднизолон; II — гидрокортизон; III — преднизолон, IV — 20β-гидроксипроизводное гидрокортизона.

производные. Когда в злюате нет кислорода, стероиды, имеющие двойную связь, трансформируются в 20β-гидроксипроизводные без двойной связи (рис. 7-11).

Обнаружено, что в анаэробных условиях или в присутствии цианида калия при трансформации преднизолона первым накапливается гидрокортизон, который затем постепенно превращается в его 20β-гидроксипроизводное (рис. 7-12 и 7-13) [17]. Следовательно, основной путь образования 20β-гидроксипроизводного гидрокортизона включает восстановление преднизолона до гидрокортизона, катализируемое 3-окостероид-Δ¹-редуктазой с последующим прямым восстановлением 20-оксогруппы под действием 20β-ГСД (схема 7-4). Такая последовательность реакций при трансформации преднизолона обусловлена очевидно тем фактом, что активность 3-окостероид-Δ¹-редуктазы выше, чем активность 20β-ГСД [17].

20β-Гидроксипроизводное гидрокортизона образуется из гидрокортизона двумя возможными путями (схема 7-5). Активность Δ¹-дегидрогеназы ингибируется в присутствии цианида и в строго анаэробных условиях. При ингибировании 3-окостероид-Δ¹-дегидрогеназы происходит прямое восстановление 20-оксогруппы гидрокортизона. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что в непрерывных условиях трансформация гидрокортизона происходит двумя путями (схема 7-5). В верхней части колонки (в присутствии кислорода) 20β-гидроксипроизводное гидрокортизона образуется под действием полиферментной системы (путь I). Вследствие высокой Δ¹-дегидрогеназной активности в присутствии кислорода весь гидрокортизон быстро окисляется до преднизолона и прямое восстановление гидрокортизона мало вероятно. В анаэробных условиях (в глубоких слоях носителя в колонке) происходит прямое восстановление гидрокортизона в 20-м положении (путь II) [17]. Основным фактором, который

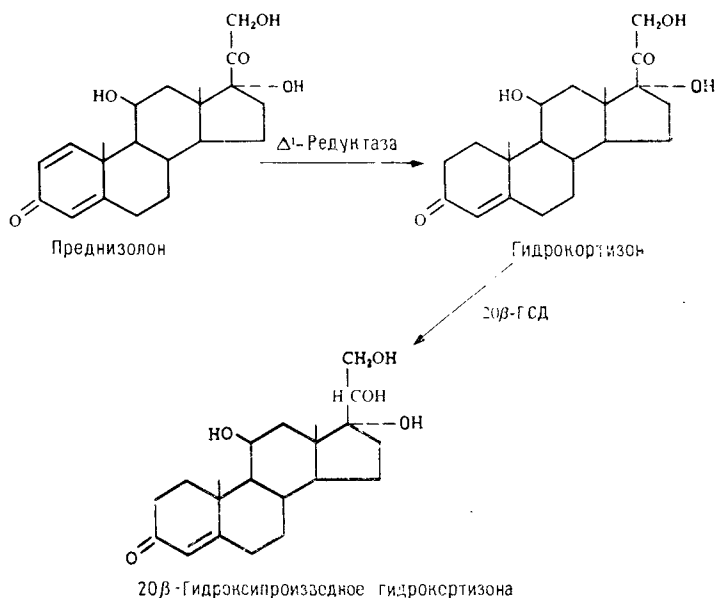


Схема 7-4. Трансформация преднизолона в 20β-гидроксипроизводное гидрокортизона.

определяет стабильность процесса 20β-восстановления в оптимальных условиях (20—22°C, pH 7,0), является концентрация клеток в носителе и скорость протока субстрата. Стабильность процесса повышается с увеличением количества включаемой в носитель биомассы и с уменьшением скорости протока. Данные о стабильности процесса 20β-восстановления гидрокортизона, который осуществляют клетки, включенные в полиакриламидный гель, представлены в табл. 7-9.

Известно, что ферментативная активность и направление процесса трансформации регулируются различными способами, в том числе путем избирательной индукции необходимого фермента. 20β-ГСД принадлежит к группе индуцибельных ферментов, а ее наиболее эффективным индуктором является прогестерон [26].

Культуру выращивают в условиях оптимального синтеза фермента по следующей методике.

1. Через 24 ч роста (табл. 7-1) собрать клетки центрифугированием и промыть их буфером.
2. Поместить 2 г клеток (сухой вес) в колбы на 750 мл, содержащие 150 мл 10 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7,2, 0,25% глюкозы и кукурузного экстракта, а также прогестерон, растворенный в этаноле в концентрации 10 мг%.
3. Инкубировать клетки на качалке при 180 об/мин, 37°C в течение 5 ч.

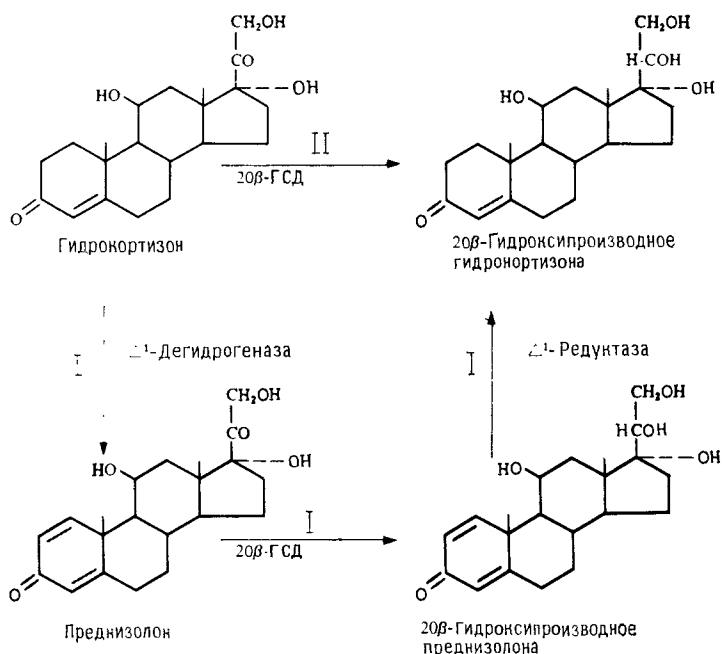


Схема 7-5. Трансформация гидрокортизона в его 20β-гидроксипроизводное.

4. Включить клетки в полиакриламидный гель и использовать для трансформации.

Как следует из табл. 7-9, добавочная индукция культуры прогестероном привела к почти 2-кратному увеличению стабильности процесса 20β-восстановления.

Известно, что 20β-ГСД принадлежит к группе NADH-зависимых ферментов. Возможно, что уменьшение выхода 20β-гидроксипроизводного гидрокортизона определяется уменьшением или вымыванием эндогенного NADH. В связи с этим мы исследовали возможность сохранения активности 20β-ГСД и стабилизации процесса в присутствии экзогенного кофактора. Как следует из рис. 7-14, когда на седьмые сутки NADH добавляли, выход продукта повышался до первоначального уровня и процесс стабилизировался в течение нескольких суток. После полного падения активности 20β-ГСД преднизолон становился единственным продуктом трансформации.

Глюкоза также оказывает стабилизирующий эффект на процесс 20β-восстановления. Добавление глюкозы (до 1 мМ) в реакционную среду приводит к двукратному увеличению периода полужизни процесса, осуществляемого клетками, адсорбированными на целлюлозе. Не исключено, что это происходит в связи с увели-

Таблица 7-9. Стабильность процесса 20 β -восстановления гидрокортизона при различных скоростях протока

Индуктор	SV, ч ⁻¹	Время ¹⁾
Кортизонацетат	0,07	5 сут
	0,14	4 сут
	0,52	2 сут
	0,7	34—36 сут
	1,05	1 сут
	2,1	8—10 ч
Кортизонацетат + прогестерон	0,07—0,14	9 сут
	0,25—0,52	5 сут

¹⁾ 100%-ное превращение гидрокортизона в 20 β -гидроксипроизводное.

чением содержания NADH в клетках (рис. 7-15). Итак, стабилизация процесса 20 β -восстановления возможна несколькими путями, из которых регенерация кофактора клетками в присутствии глюкозы — наиболее экономичный.

Селективное образование преднизолонa по схеме 7-5 происходит только после полного падения активности 20 β -ГСД. Для подавления активности 20 β -ГСД применяют следующие воздействия: 1) замораживание — оттаивание интактных клеток; 2) термальная обработка при 50 °C; 3) трансформация в присутствии экзогенных акцепторов электронов.

Влияние экзогенных хинонов на 20 β -восстановление изучают при добавлении феназинметасульфата и менадиона к фосфатному буферу, содержащему гидрокортизон. Гидрокортизон вводят в среду в виде этанольного раствора (конечная концентрация этанола 1%). В этом случае, как видно на рис. 7-16, при SV=1,05 ч⁻¹ 20 β -гидроксипроизводное селективно образуется в течение 24 ч. На вторые сутки образуется 30% гидрокортизона и 15—20% его

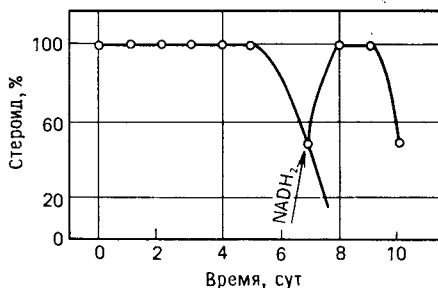


Рис. 7-14. Влияние экзогенного NADH на 20 β -восстановление (концентрация клеток 11 мг/мл геля, SV=0,65 ч⁻¹).

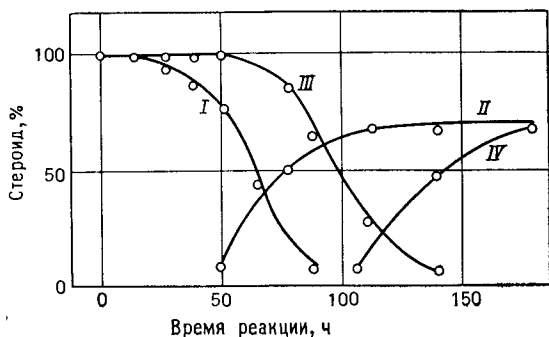


Рис. 7-15. Влияние глюкозы на динамику 20 β -восстановления и Δ^1 -дегидрирования во время трансформации гидрокортизона клетками *A. globiformis*, адсорбированными на целлюлозе в непрерывных условиях (колонка 2 $\times$ 6 см, содержащая 40 мг клеток). I, II — трансформация гидрокортизона в отсутствие глюкозы; III, IV — трансформация гидрокортизона в присутствии глюкозы; I, III — 20 β -восстановленное производное гидрокортизона; II, IV — преднизолон.

гидроксипроизводного. Начиная с третьих суток непрерывной трансформации в течение 17 дней сохраняется количественный выход преднизолонa (в данном эксперименте клетки включали в полиакриламидный гель в течение 15 мин при 15—18 $^{\circ}$ C, т. е. в неоптимальных условиях полимеризации). Как показано экспериментально, иммобилизованные клетки *A. globiformis* способны осуществлять Δ^1 -дегидрирование, 20 β -восстановление и Δ^1 -восстановление.

Направление ферментативного процесса определяется условиями трансформации: например температурными условиями, pH среды, скоростью протока субстрата, присутствием экзогенных акцепторов электронов и кофакторов и концентрацией клеток в

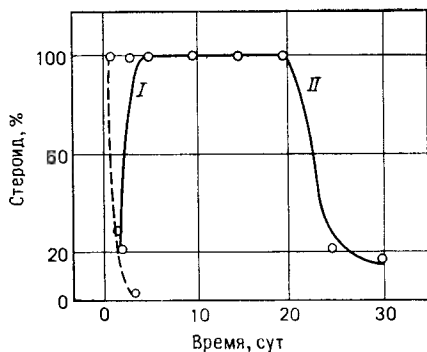


Рис. 7-16. Трансформация гидрокортизона в присутствии менадиона. I — 20 β -гидроксипроизводное гидрокортизона; II — преднизолон (концентрация иммобилизованных клеток 11 мг/мл гранул).

гранулах. Различные комбинации этих факторов позволяют проводить процессы Δ^1 -дегидрирования, 20β -восстановление или Δ^1 -восстановления.

3.3. 11α -, 11β -Гидроксилирование

11α - и 11β -гидроксилирование стероидных соединений — одна из наиболее важных реакций в синтезе стероидов. Она характерна для микроорганизмов различных таксономических групп, чаще всего грибов. Поскольку ферменты, вводящие гидроксильные группы в стероидное ядро, крайне лабильны, их до сих пор не удалось получить в очищенном виде. Большинство исследований, посвященных гидроксилированию стероидных соединений, проведено на целых клетках, и поэтому механизм реакций и природа ферментов изучены еще далеко недостаточно. Предполагают, что для гидроксилирования необходим молекулярный кислород, система регенерации кофактора и цитохром P_{450} -оксидазная система. Это означает, что успешное гидроксилирование возможно лишь с живыми клетками.

Культура *Tieghemella orchidis* ИБФМ F-233 использована для гидроксилирования кортексолона и его 21-ацетата в 11α - и 11β -положении (схема 7-6).

Гидроксилазная активность мицелия *T. orchidis*, включенного в полиакриламидный гель в условиях, оптимальных для клеток

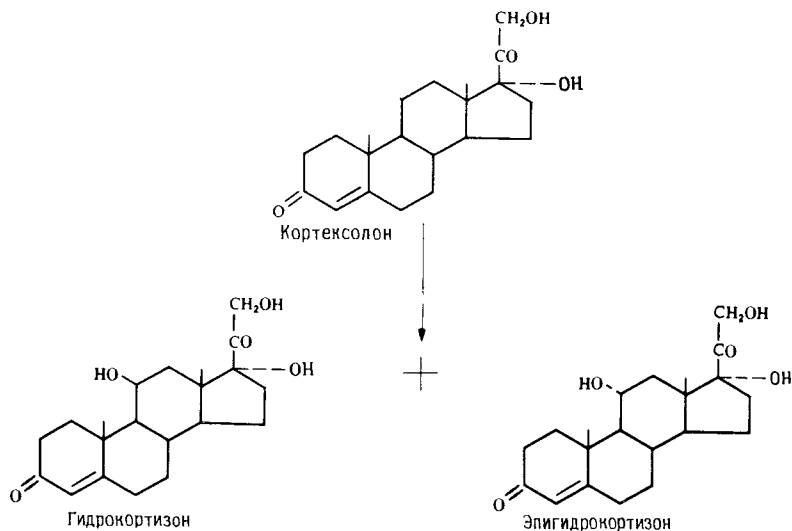


Схема 7-6. Гидроксилирование кортексолона.

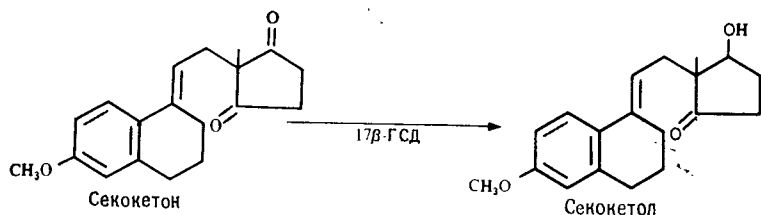


Схема 7-7. Стереоспецифическое 17 β -восстановление.

A. globiformis (позволяющих сохранить его жизнеспособность), практически равна активности свободных клеток, но не отличается стабильностью. Мицелий этой культуры включенный в Са-альгинатный гель и в фоточувствительный поперечно-сшитый полимер, менее активен, чем свободный, причем в данном случае инкубация в питательной среде дает незначительный положительный эффект.

3.4. Асимметричное 17 β -восстановление

3-метокси- $\Delta^{1,3,5(10),9(11)}$ -8,14-секоэстратетрадиона-14,17

Реакция асимметричного 17 β -восстановления 3-метокси- $\Delta^{1,3,5(10),9(11)}$ -8,14-секоэстратетрадиона-14,17 (секокетона) необходима для получения секокетола — оптически активного соединения, имеющего большое практическое значение. Секокетол — предшественник в синтезе многих стероидных гормонов. Для проведения этой реакции могут быть использованы свободные и иммобилизованные клетки *Saccharomyces cerevisiae* ВКМУ-488, обладающие специфической активностью, благодаря которой образуется оптически чистый секокетол (схема 7-7). Для реакции, катализируемой индуцибельным ферментом 17 β -ГСД в качестве кофактора необходим восстановленный NAD [27]. Дрожжевые клетки включали в полиакриламидный гель, в мембраны из поливинилового спирта и адсорбировали на различных носителях. Наилучшие результаты были получены с полиакриламидным гелем, инкубированным в питательной среде. Для приготовления гранул, активность которых равна или выше активности свободных клеток, достаточно однократной инкубации в течение суток. После 45 трансформаций (концентрация секокетона 1 г/л) через 45 сут активность снижается лишь на 20%. Электронно-микроскопические исследования показали, что дрожжи и через 45 сут способны к активному криптогенному росту на буферной среде [27].

Литература

1. Кощеев К. А. Прикл. биохим. микробиол., 27, 477 (1981).
2. Кощеев К. А. Микробиология, 11, 55, 1981.
3. Fukui S., Tanaka A. Ann. Rev. Mikrobiol., 36, 145 (1982).

4. *Kolot F. B.* Process Biochem, **17**, 12 (1982).
5. *Suzuki S., Karube I.* In: Enzyme Engineering, vol. 4, (Broun G. B., Manecke G. and Wingard L. B., eds.) Plenum Press, New York and London, p. 329, 1978.
6. *Mosbach K., Larsson P.* Biotechnol. Bioeng., **12**, 19 (1970).
7. *Larsson P., Ohlson S., Mosbach K.* In: Enzyme Engineering. Vol. 4, (Broun G. B., Manecke G., Wingard L. B., eds.), Plenum Press, New York and London, p. 317, 1978.
8. *Ohlson S., Larsson P., Mosbach K.* Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **7**, 103 (1979).
9. *Malik V. S. Z.* Allg. Microbiol., **4**, 261 (1982).
10. *Atrat P. Z.* Allg. Microbiol., **10**, 723 (1982).
11. *Fukui S., Omata T., Yamane T., Tanaka A.* In: Enzyme Engineering. Vol. 5 (Weetal H. H., Royer G. P., eds.), Plenum Press, New York and London, p. 347, 1980.
12. *Fukui S., Tanaka A.* In: Enzyme Engineering, Vol. 6, Plenum Press, New York and London, p. 203, 1982.
13. *Atrat P., Huller E., Hörhold C., Buchar M. I., Arinbasarova A. Y.* Koshcheyenko K. A. Z. Allg. Microbiol., **20**, 159 (1980).
14. *Atrat P., Hörhold C., Buchar M., Koshcheyenko K. A. Z.* Allg. Microbiol., **20**, 239 (1980).
15. *Скрябин Г. К., Звягинцева И. С., Назарук М. М., Соколова Л. В.* Докл. АН СССР, **161**, 472 (1965).
16. *Скрябин Г. К., Звягинцева И. С., Назарук М. М.* Прикладная биохим. микробиол., **2**, 271 (1966).
17. *Аринбасарова А. Ю., Меденцев А. Г., Акименко В. К., Кощеев К. А.* Биохимия, **50**, 1, 3 (1985).
18. *Меденцев А. Г., Аринбасарова А. Ю., Акименко В. К., Кощеев К. А.* Биохимия, **48**, 17 (1983).
19. *Маурер П.* Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. М., Мир, с. 13, 1971.
20. *Freeman A., Blank T., Aharowitz Y.* Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol, **14**, 13 (1982).
21. *Кощеев К. А., Аврамова Т. Л., Суходольская Г. В.* Изв. Академии наук СССР, сер. биол., **2**, 174 (1981).
22. *Koshcheyenko K. A., Sukhodolskaya G. V., Tyurin V. S., Skryabin G. K.* Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **12**, 161 (1981).
23. *Kierstan M., Bucke C.* Biotechnol. Bioeng., **19**, 387 (1977).
24. *Sonomoto K., Hoo M. D. M., Tanaka A., Fukui S. J.* Ferment. Technol. **59**, 465 (1981).
25. *Бухар М. И., Лестровая Н. Н.* Биохимия, **35**, 843 (1970).
26. *Готовцева Н. Н., Коровкина А. С.* Микробиология, **52**, 3, 434, (1973).
27. *Koshcheyenko K. A., Turkina U. V., Skryabin G. K.* Enzyme Microb. Technol., **5**, 13 (1983).

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ РАСТИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ: МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СПОСОБНОСТЬ К БИОСИНТЕЗУ

П. Броделиус

1. Введение

Изолированные растительные клетки, как и клетки микроорганизмов, можно культивировать *in vitro* в колбах на качалках или в ферментерах, а возможность использования культур растительных клеток для получения биопрепаратов уже давно общепризнана. Из примерно 30 000 известных природных соединений более 90 % можно обнаружить в высших растениях. Культивируемые растительные клетки тотипотентны, т. е. в принципе в них может экспрессироваться вся генетическая информация, и, следовательно, любое вещество, находящееся в интактном растении, можно получить, культивируя клетки данного растения. В настоящее время многие из промышленно важных соединений, используемых в фармацевтической, пищевой и парфюмерной промышленности, выделяют из тканей возделываемых или дикорастущих растений. Эти вещества имеют сложное химическое строение, и поэтому их трудно получить каким-либо другим способом. Возможности получения некоторых важных видов растительного сырья ограничены уже сегодня или могут стать ограниченными в ближайшем будущем. В связи с этим настоятельно необходимы поиски и разработка альтернативных источников. Одним из таких источников являются культуры растительных клеток; за последнее десятилетие в этой области достигнуты значительные успехи [1, 2]. Так, недавно в Японии был впервые внедрен промышленный способ получения природного соединения (шиконина), основанный на культивировании растительных клеток [3].

Однако для промышленного использования культур растительных клеток с целью получения широкого спектра органических соединений необходимо решить ряд основных проблем. Растительные клетки в культуре значительно отличаются от клеток микроорганизмов, поэтому новые способы ферментации, разработанные для последних, в большинстве случаев не годятся для культивирования растительных клеток. Более того, характерные для растительных клеток медленный рост, способность к агрегации, низкий выход и генетическая нестабильность затрудняют их использование в крупных масштабах.

Преимущества иммобилизованных биокатализаторов широко признаны в настоящее время [4, 5], и в течение последних лет мы проводили исследования с целью установить, распространя-

ются ли эти преимущества на имобилизованные растительные клетки [6—8]. Мы изучали биосинтез различных соединений в модельных системах, подобранных таким образом, чтобы они включали различные виды биосинтеза: синтез *de novo* из простых источников углерода (например, сахарозы), синтез из добавленных к питательной среде предшественников или биоконверсия (например, гидроксилирование). Для сохранения биосинтетической активности большое значение имеет жизнеспособность клеточных препаратов, поэтому применялись различные методы иммобилизации и изучалась жизнеспособность и биосинтетическая активность полученных препаратов.

2. Методы иммобилизации растительных клеток

Растительные клетки достаточно чувствительны к изменениям окружающей среды, и, следовательно, для иммобилизации могут быть использованы только наиболее мягкие методы. Установлено, что для крупных чувствительных растительных клеток самым подходящим из широко используемых методов иммобилизации является включение в гель. Известны также примеры иммобилизации растительных клеток методами адсорбции и ковалентной сшивки. Иммобилизацию растительных клеток проводят в стерильных условиях, поскольку растительные клетки растут относительно медленно и, следовательно, очень чувствительны к заражению быстро растущими клетками микроорганизмов. В связи с этим используемый для иммобилизации носитель должен выдерживать соответствующую обработку, например автоклавирование.

2.1. Включение в гель

Для иммобилизации растительных клеток путем включения в гель можно использовать несколько различных методик. Конечная концентрация иммобилизованных клеток в препарате может варьировать в широких пределах [от нескольких процентов до 50% (по весу) и выше]. Оптимальную концентрацию клеток нужно определять отдельно для каждого конкретного случая. В методиках, описанных ниже, концентрация иммобилизованных клеток составляла 20% (по весу).

2.1.1. Альгинатные гели

Для иммобилизации клеток различных типов, в том числе растительных, широко используют альгинат кальция (гл. 3). Для наших первых экспериментов по иммобилизации различных клеток мы выбрали этот полимер не случайно. Условия включения в гель альгината кальция очень мягкие, полимер можно стерили-

Таблица 8-1. Включение растительных клеток в альгинатный гель (в небольших количествах)

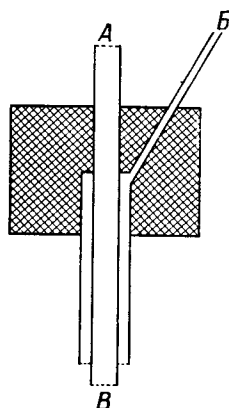
1. Раствор альгината натрия (например, 2%-ный протаналь HF, Protan A/S, Норвегия), приготовленный в специальной среде, простерилизовать в автоклаве (20 мин, 121 °C).
2. Растительные клетки отделить центрифугированием или фильтрацией, а затем с помощью стерильного шпателя суспендировать их (сырой вес 2,0 г) в охлажденном растворе альгината (8,0 г) в стерильном стакане объемом 25 мл.
3. Полученную суспензию клеток в растворе альгината перенести в обычный пластмассовый шприц (10 мл), из которого предварительно удален поршень.
4. Шприц укрепить над колбой Эрленмейера, в которой находится среда (50 мл) с добавкой 50 мМ CaCl_2 . Дать возможность суспензии клеток в растворе альгината капать из шприца в осторожно перемешиваемый раствор, содержащий кальций.
5. Образовавшиеся гранулы геля оставить в растворе на 30 мин, а затем отобрать и промыть средой.
6. Гранулы перенести в соответствующую среду с CaCl_2 (≥ 5 мМ).

зовать автоклавированием, и кроме того, процесс иммобилизации обратим, что достигается добавлением агента, связывающего кальций (например, ЭДТА или лимонной кислоты). На начальных этапах исследования обратимость иммобилизации была особенно важна, поскольку необходимо было исследовать свойства клеток после того, как они некоторое время находились в иммобилизованном состоянии.

Конечная концентрация альгината в препарате иммобилизованных клеток может быть разной в зависимости от типа используемого альгината. Стабильность геля возрастает с увеличением концентрации полимера, но при высоких концентрациях альгината суспензия альгинат/клетки становится очень вязкой, что может затруднить процесс образования гранул. Поэтому необходимо подобрать такие условия, которые бы позволили достаточно простым способом получить стабильный гель. Следует также отметить, что при автоклавировании вязкость раствора альгината натрия уменьшается из-за частичного гидролиза полимера; в связи с этим автоклавирование нельзя проводить дольше положенного времени.

Небольшие порции растительных клеток, включенных в альгинатный гель, можно легко получить, используя обыкновенные пластмассовые стерильные шприцы. При использовании иглы для подкожных инъекций с целью получения более мелких гранул следует принять специальные меры, чтобы избежать засорения иглы крупными агрегатами клеток. Для этого необходимо профильтровать суспензию через стерильное сито (металлическое или нейлоновое) с соответствующим размером ячеек. Кроме того, чтобы уменьшить гидродинамическое сопротивление, иглу нужно

Рис. 8-1. Схема прибора для приготовления мелких гранул альгинатного геля. *A* — отверстие для подачи суспензии клеток в растворе альгината; *B* — отверстие для подачи сжатого воздуха; *B* — отверстие для отвода суспензии клеток в растворе альгината в воздушном потоке.



обрезать, оставив участок длиной несколько миллиметров. Детальное описание данной методики дано в табл. 8-1.

Используя иглы разного диаметра, можно с помощью шприца получать гранулы различных размеров, от 2 до 4 мм в диаметре. Для получения более мелких гранул можно применять прибор, изображенный на рис. 8-1. Подавая стерильный воздух на конец иглы, удается преодолеть поверхностное натяжение вязкой суспензии клеток в растворе альгината. Этот способ позволяет получать гранулы диаметром 0,2—1 мм. Иммобилизованные клетки, как правило, инкубируют в непроточной системе согласно методике, описанной ниже.

Во время созревания гранулы геля несколько сжимаются за счет вытеснения воды, так как ионы кальция диффундируют внутрь гранул и связываются с цепями полимера, уплотняя его пространственную структуру. Степень сжатия гранул зависит от типа используемого альгината и от его концентрации. При проведении количественных экспериментов необходимо:

1. Взвесить колбу со средой перед добавлением суспензии клеток в растворе альгината.
2. После добавления суспензии взвесить ее еще раз.
3. Рассчитать количество добавленной суспензии клеток в растворе альгината и сырой вес гранул геля после промывки и фильтрации. Концентрацию клеток (по весу) рассчитать по следующему уравнению:

$$C = C_0 \frac{\text{Вес добавленной суспензии клеток в альгинате}}{\text{Вес гранул геля}}$$

где C — концентрация клеток в гранулах геля (по весу);
 C_0 — концентрация клеток в суспензии (по весу).

Для иммобилизации растительных клеток в альгинатный гель (в больших количествах) используют прибор, схематически изображенный на рис. 8-2. Методика включения растительных клеток в альгинатный гель с помощью данного прибора описана в табл. 8-2.

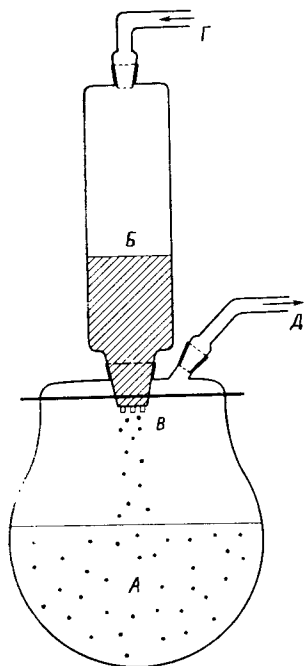


Рис. 8-2. Схема прибора для включения растительных клеток в альгинатный гель в больших количествах. А — закрытый сосуд объемом 1 л, содержащий среду; В — резервуар объемом 0,4 л для суспензии клеток в растворе альгината; В — шесть трубочек для образования капель (внутренний диаметр 1 мм); Г — отверстие для подачи стерильного воздуха; Д — отверстие для отвода воздуха.

2.1.2. κ -Каррагинан

κ -Каррагинан представляет собой полисахарид, содержащий сульфогруппы (сульфированы более 20% остатков сахара) и не растворимый в холодной воде. Однако при нагревании он растворяется, а при последующем охлаждении образует гель. Температура образования и качество геля зависят как от концентрации полимера, так и от количества и типа присутствующих в растворе катионов (например, K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} или Ba^{2+}). Так, 5%-ный водный раствор κ -каррагинана, поставляемого фирмой Sigma Chemical Co.

(тип III), находится в жидком состоянии при температуре $\geq 45-50^\circ C$, а такой же раствор препарата каррагинана, поставляемого фирмой FMC Corporation (NJAL 798), специально предназначенного для иммобилизации клеток, — при температуре $\geq 25-30^\circ C$. Очевидно, для иммобилизации чувствительных растительных клеток лучше использовать последний. Различные методики включения клеток в гель каррагинана представлены в табл. 8-3.

2.1.3. Агар/агароза

Агар и агароза (очищенный препарат агара) образуют гели при охлаждении горячего раствора. Для понижения температуры гелеобразования агарозу можно химически модифицировать введением гидрокспэтильных групп. Оптимальная температура гелеобразования при иммобилизации растительных клеток $25-30^\circ C$. Можно использовать, например, агарозу типа VII фирмы Sigma или агарозу SeaPlaque фирмы FMC.

Преимуществом геля агарозы является то, что он стабилен в отсутствие противоионов. Однако механическая стабильность агарозного геля ниже, чем альгинатного или геля каррагинана при

Таблица 8-2. Включение растительных клеток в альгинатный гель (в больших количествах)

1. Простерилизовать в автоклаве весь прибор (рис. 8-2) с внесенной в сосуд *A* средой (500 мл), содержащей кальций, и взвесить его.
2. Смешать альгинат (240 г) и растительные клетки (сырой вес 60 г) и внести смесь в резервуар *B*.
3. Под небольшим давлением стерильного воздуха продавить вязкую суспензию клеток в растворе альгината через 6 трубочек *B*, в результате чего образуются гранулы одинакового размера. Среду в сосуде *A* осторожно перемешивать.
4. Прибор взвесить и оставить на 30 мин.
5. Гранулы геля отфильтровать, промыть, взвесить и перенести в соответствующую среду. Концентрацию клеток в гранулах геля рассчитать по уравнению, приведенному в разд. 2.1.1.

одинаковой концентрации полимера. Кроме того, агароза значительно дороже альгината и каррагинана.

Для иммобилизации растительных клеток в агар или агарозу можно использовать методики *B* и *B* табл. 8-3, описанные для каррагинана, исключив при этом из среды ионы калия.

2.1.4. Полиакриламид

В последнее время для иммобилизации клеток микроорганизмов широко применяют полиакриламид. Однако некоторые вещества, используемые при радикальной полимеризации акриламида, токсичны для растительных клеток. Поэтому в нашей лаборатории данным методом иммобилизации пользовались редко.

Позднее были разработаны методы, позволяющие уменьшить токсичность акриламида и других реагентов [11, 12], что позволило получить жизнеспособные растительные клетки, иммобилизованные в полиакриламидном геле [13, 14].

Фриман и др. [11, 13] разработали оригинальный метод устранения контакта между клетками и токсичными веществами. Полученный линейный полимер полиакриламида, содержащий гидразиновые группы, смешивали с клетками, а затем полимерные цепи сшивали диальдегидом (например, глюксалем). Клетки *Mentha*, иммобилизованные данным способом, сохраняли жизнеспособность и биосинтетическую активность [например, превращали (—)-ментон в (+)-неоментол].

Роузвиза и др. [12, 14] предложили другой способ уменьшения токсичности акриламида. Сначала клетки смешивали с вязким раствором (альгината или ксантана), а затем добавляли раствор мономера и быстро проводили полимеризацию. При таком методе иммобилизации растительные клетки (например, *Catharanthus roseus*), включенные в гель, оставались жизнеспособными.

Таблица 8-3. Методы включения клеток в каррагинан

*Методика А*¹⁾

1. Растворить при нагревании каррагинан с низкой температурой гелеобразования (3%, вес/объем; фирмы FMC, NJAL 798) в 0,9%-ном NaCl и простерилизовать в автоклаве в течение 20 мин при 121 °C.
2. Отобранные растительные клетки (сырой вес 2,0 г) суспендировать в растворе каррагинана (8,0 г) при 35 °C в стерильном стакане и быстро перенести в пластмассовый шприц.
3. Шприц поместить над стаканом, чтобы суспензия капала в среду, содержащую 0,3 М KCl.
4. Образовавшиеся гранулы каррагинана оставить в среде с калием на 30 мин, а затем отфильтровать, промыть и перенести в соответствующую среду.

*Методика Б*²⁾

1. Суспензию клеток в растворе каррагинана, приготовленную по методике А, залить в специальную форму, состоящую из двух тефлоновых пластин толщиной 1—2 мм, в одной из которых проделано много отверстий диаметром 1—2 мм [9]. Пластины скреплены между собой зажимами.
2. Суспензию равномерно распределить стерильным шпателем. После охлаждения затвердевшие цилиндрические гранулы геля перенести на 30 мин в среду, содержащую 0,3 М KCl.
3. Гранулы геля промыть и поместить в соответствующую среду.

*Методика В*³⁾

1. Суспензию клеток в растворе каррагинана, приготовленную по методике А, медленно вылить при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в растительное масло (40 мл), простерилизованное в автоклаве (20 мин, 121 °C) и охлажденное до 35 °C.
2. После образования капель соответствующего размера смесь охладить в ледяной бане до ~10 °C. При этой температуре полимер затвердевает и образуются гранулы геля с включенными клетками.
3. Смесь перенести в стаканы для центрифугирования, наполненные на одну треть 0,3 М KCl, и отцентрифугировать в течение 2 мин при 400 g.
4. Используя аспиратор с ловушкой для сбора масла, удалить масляную фазу и большую часть водной фазы, а затем промыть гель до полного удаления масла.
5. Гранулы геля оставить на 30 мин в 0,3 М KCl, а затем отфильтровать.

¹⁾ Как правило, среды для растительных клеток содержат значительное количество калия, что способствует сохранению гранул каррагинана в интактном состоянии. Однако, используя данную методику, гранулы одинакового размера получить довольно трудно.

²⁾ Эту методику можно использовать только для получения небольших количеств иммобилизованных клеток.

³⁾ Используя данную методику, можно получать гранулы одинаковой формы и размера [10]. В случае необходимости гранулы фракционируют, просеивая через металлические сетки. Размер гранул можно регулировать, меняя скорость перемешивания в процессе гелеобразования. Гранулы каррагинана, полученные по данной методике, показаны на рис. 8-3, А.

2.1.5. Другие носители

Для иммобилизации растительных клеток используют и другие носители, такие как пенополиуретан [15] и предполимеры уретана [16].

Для иммобилизации клеток *Capsicum frutescens* и *Daucus carota* к суспензии их культур добавляли предварительно приготовленные кубики (10×10×10 мм) пористого полиуретана [15]. Клетки проникали в частицы пены и оставались связанными с ними в течение всего периода культивирования, составляющего 21 сут. При этом иммобилизованные клетки сохраняли высокую жизнеспособность. После пересева в свежую среду через 3—4 сут в иммобилизованном состоянии оставалось не менее 95% клеток.

Для иммобилизации биокатализаторов можно использовать предполимеры уретана с концевыми функциональными изоцианатными группами [17]. При смешивании таких предполимеров с каким-либо водным раствором, например клеточной суспензией, гель образуется в течение нескольких минут. В присутствии воды предполимеры уретана реагируют друг с другом с образованием карбаматных связей. Иммобилизованные данным способом клетки *Lavandula vera* использовали для получения пигмента [15].

2.1.6. Иммобилизация в мембранах

Для иммобилизации растительных клеток можно использовать мембраны различной конфигурации. Впервые иммобилизация растительных клеток данным методом была продемонстрирована на полых трубчатых реакторах [18, 19]. Растительные клетки наносят на наружную поверхность полый трубки и через нее с относительно высокой скоростью прокачивают обогащенную кислородом питательную среду. При изучении модельной системы было показано, что в полном трубчатом реакторе иммобилизованные клетки *Glycine max* продуцируют фенольные соединения с постоянной скоростью в течение 700 ч [19]. Следует отметить также, что метаболизм растительных клеток в большой степени зависит от размера пор используемой мембраны [20].

2.2. Адсорбция

Иммобилизация с помощью адсорбции на твердых носителях является очень мягким методом. Однако до настоящего времени его не использовали для иммобилизации растительных клеток. Связывание клеток частицами пенополиуретана, описанное выше, по крайней мере частично происходит за счет адсорбции.

Для адсорбции растительных протопластов использовали микроносители [21]. Растительные протопласты, адсорбированные на поперечно-сшитом декстрани, содержащем ДЭАЭ-группы (Cyto-dex 1, Pharmacia, Швеция), сохраняли свою жизнеспособность.

2.3. Ковалентное связывание

Метод ковалентного связывания клеток микроорганизмов с твердым носителем применяют достаточно редко. Что же касается его использования в случае растительных клеток, то известен только один пример ковалентной сшивки клеток *Solanum aviculare* с нерастворимой матрицей из полифениленоксида [22]. Носитель активировали глутаровым альдегидом, и после удаления избытка глутарового альдегида гель добавляли к суспензии растительных клеток. Имобилизованные клетки использовали в колонном реакторе для получения стероидных гликозидов в течение 11 сут.

3. Жизнеспособность иммобилизованных растительных клеток

В большинстве случаев необходимо, чтобы растительные клетки после иммобилизации сохраняли жизнеспособность. Это особенно важно, когда в процесс синтеза *de novo* вовлечены все пути метаболизма клетки.

3.1. Окрашивание

3.1.1. Флуоресцеиндиацетат

Окрашивание флуоресцеиндиацетатом (ФДА) часто используют для определения жизнеспособности клеток. После адсорбции ФДА клетками при наличии эстеразной активности он деацетируется и становится флуоресцирующим. Окрашенные клетки рассматривают с помощью микроскопа, снабженного УФ-источником света. На рис. 8-3, Б показаны иммобилизованные клетки, окрашенные ФДА.

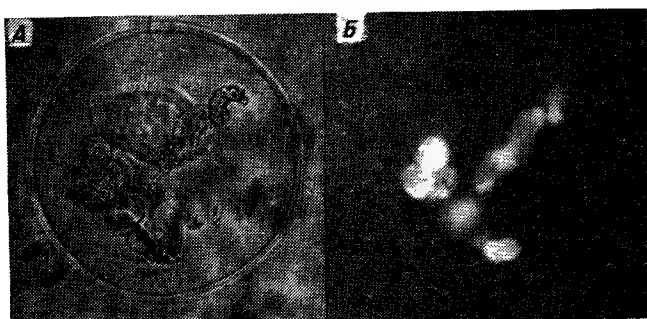


Рис. 8-3. А. Гранула каррагинана, содержащая 10% (по весу) клеток *D. salicaria*, которая была получена по методике В, описанной в табл. 8-3. Б. Та же гранула, окрашенная ФДА.

3.1.2. Карбол-фуксин

Выраженное в процентах отношение клеток, находящихся в данный момент времени на какой-либо стадии митоза, к их общему числу в популяции называют митотическим индексом (МИ). По его изменению в течение инкубации можно судить о жизнеспособности клеток. Удобным красителем для окраски хромосом после фиксации является карбол-фуксин. Зависимость митотического индекса от времени инкубации для суспендированных в среде и иммобилизованных растительных клеток представлена на рис. 8-4.

Детальное описание методов определения жизнеспособности иммобилизованных растительных клеток с использованием вышеуказанных красителей дано в табл. 8-4.

3.2. Дыхание

О жизнеспособности клеток судят по их дыханию, которое можно измерять в течение инкубации через различные промежутки времени. Измерения проводят с помощью кислородного электрода Кларка по следующей стандартной методике. Клетки, суспендированные в среде (сырой вес 100—200 мг), или соответствующее количество иммобилизованных клеток (общий объем 5 мл) инкубируют при 25 °С. С помощью самописца регистрируют потребление кислорода, определяют сухой вес клеток (см. ниже) и рассчитывают удельную скорость дыхания.

Очень часто дыхание иммобилизованных клеток менее интенсивно, чем дыхание такого же количества суспендированных в среде клеток, что объясняется диффузионными затруднениями внутри полимерной сетки (рис. 8-5).

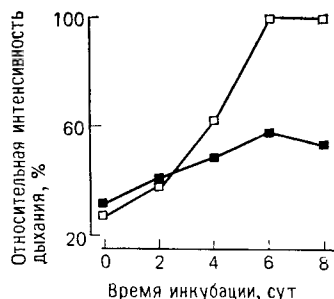
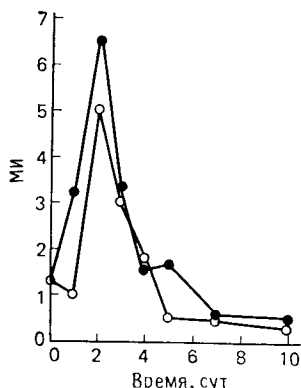


Рис. 8-4. Митотический индекс для суспендированных в среде (светлые кружки) и включенных в агарозный гель (темные кружки) клеток *C. roseus*.

Рис. 8-5. Дыхание клеток *C. roseus*, включенных в альгинатный гель (темные квадраты), и тех же клеток после растворения полимера (светлые квадраты).

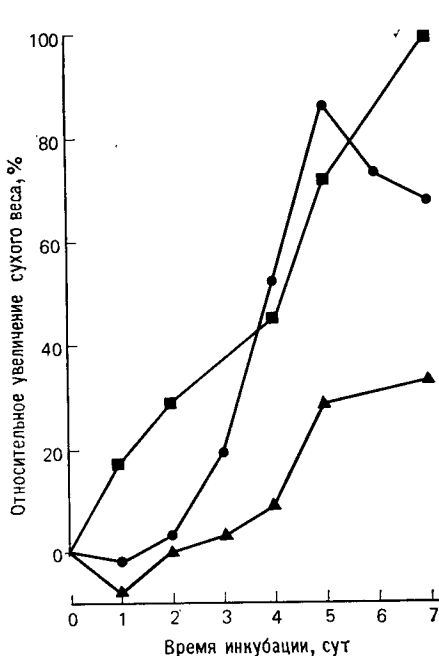


Рис. 8-6. Зависимость увеличения сухого веса суспендированных в среде (кружки), включенных в агарозный (квадраты) и альгинатный (треугольники) гели клеток сои *Glycine max* от времени инкубации.

3.3. Рост и деление клеток

Увеличение числа и веса клеток является хорошим показателем их жизнеспособности. Однако в культуре число растительных клеток определить очень трудно, поскольку клетки растут в виде агрегатов различных размеров. Гораздо проще определить вес клеток (сырой или сухой). Сухой вес иммобилизованных клеток предпочитают, исходя из предположения, что сухой вес полимерной матрицы во время инкубации не изменяется. На рис. 8-6 приведена зависимость увеличения

сухого веса растительных клеток от времени инкубации. Сухой вес клеток определяют следующим образом.

1. Суспендированные в среде клетки (сырой вес 0,5—1,0 г) или же соответствующее количество иммобилизованных клеток высеять в колбы Эрленмейера (объем 25 мл), содержащие 10 мл среды.
2. Отбирать ежедневно или через день пробы и определять сухой вес клеток, перенося их на предварительно взвешенную фильтровальную бумагу.
3. Помещенные на фильтровальную бумагу клетки промыть водой и сушить при 60—80 °C до тех пор, пока вес не станет постоянным.
4. В случае препаратов иммобилизованных клеток необходимо вычест сухой вес используемого полимера.

Чтобы определить, делятся ли клетки, можно использовать методику определения митотического индекса, описанную выше.

4. Способность иммобилизованных растительных клеток к биосинтезу

В клетках высших растений протекает множество химических реакций, которые можно использовать для синтеза сложных органических соединений. Наряду с реакциями биоконверсии, такими

Таблица 8-4. Определение жизнеспособности иммобилизованных растительных клеток методом окрашивания

Флуоресцеиндиацетат

1. Приготовить 0,5%-ный раствор ФДА в ацетоне и хранить его при -20°C . Раствор для окрашивания приготовить в день опыта, добавляя по каплям исходный 0,5%-ный раствор ФДА к 10 мл среды до появления устойчивой молочной окраски.
2. Полученный раствор добавить к суспендированным в среде или иммобилизованным клеткам (1:1) и через 5 мин исследовать смесь с помощью флуоресцентного микроскопа (возбуждающее излучение 330—380 нм; регистрация флуоресценции при длине волны >420 нм).
3. Препарат иммобилизованных клеток разрезать скальпелем на тонкие пластинки.
4. Определить общее число клеток, а также число флуоресцирующих клеток и рассчитать процент жизнеспособных клеток.

Карбол-фуксин

1. Свободные или иммобилизованные клетки обработать фиксирующим раствором [ледяная уксусная кислота:этанол (1:3)] в течение 30 мин. **Внимание!** Перед фиксацией препарат иммобилизованных клеток необходимо нарезать на тонкие пластинки.
2. Фиксированные клетки перенести на предметное стекло и добавить равное количество раствора карбол-фуксина (3 г на 100 мл 70%-ного этанола).
3. Через несколько минут образец накрыть покровным стеклом и нагреть до появления мелких пузырьков.
4. Накрыв образец тонкой бумагой, осторожно прижать покровное стекло. Препарат поместить в поле зрения микроскопа и подсчитать клетки с ядрами, окрашенными в красный цвет. Насчитав по крайней мере 500 таких клеток, определить число клеток, находящихся на какой-либо стадии митоза. Рассчитать митотический индекс:

$$\text{МИ} = \left[\frac{\text{Число клеток на стадиях митоза}}{\text{Общее число клеток}} \right] \times 100.$$

как гидроксילирование, метилирование и т. д., в растительных клетках осуществляется синтез органических соединений de novo из более простых соединений углерода. Иммобилизованные растительные клетки, сохранившие жизнеспособность, по-видимому, обладают такой же биосинтетической активностью, как и суспендированные в среде. Ниже приведены примеры, иллюстрирующие способность иммобилизованных растительных клеток к биосинтезу.

4.1. Биоконверсия

4.1.1. 12-β-Гидроксילирование

12-β-Гидроксילирование производного дигитоксина с образованием производного дигоксина представляет промышленный интерес. Эту реакцию способны осуществлять как суспендированные в среде, так и иммобилизованные клетки *Digitalis lanata* в периодическом [23] или непрерывном [24] режимах (табл. 8-5).

Таблица 8-5. 12-β-Гидроксилирование дигитоксина
иммобилизованными клетками *D. lanata*

Методика 1

1. Клетки *D. lanata* (сырой вес 3 г) суспендировать в 3%-ном растворе альгината (10 г; Sigma тип IV) и иммобилизовать по методике, описанной в табл. 8-4.
2. Иммобилизованные клетки (30 гранул геля) проинкубировать в среде (25 мл), содержащей дигитоксин (500 мкг), на качалке (100 об/мин).
3. В отобранных образцах определить содержание дигитоксина методом радиоиммуноанализа. Иммобилизованные клетки *D. lanata* продуцируют дигитоксин в течение как минимум 33 сут.

Методика 2

1. Клетки *D. lanata* с повышенной гидроксилирующей активностью включить в альгинатный гель и нанести на колонку (3×20 см).
2. Пропустить через колонку со скоростью 22 мл/ч 50 мкМ раствор дигитоксина.
3. Содержание дигитоксина в элюате определить методом радиоиммуноанализа. Максимальный выход продукта составляет 77%. После 70 сут непрерывной работы колонки иммобилизованные клетки сохраняют 70—80% активности.

Клетки *Digitalis*, иммобилизованные в альгинатном геле по методике, приведенной в табл. 8-5, могут быть использованы для гидроксилирования метилдигитоксина в метилдигитоксин в периодическом режиме в течение 180 сут (если каждые трое суток гранулы геля с иммобилизованными клетками переносить в свежую среду) [25]. В данном случае время использования иммобилизованных клеток значительно превышает соответствующее время для клеток, суспендированных в среде; следовательно, с помощью иммобилизованных клеток удастся получить более высокий выход продукта на единицу биомассы.

4.1.2. Восстановление двойной связи

Культивируемые клетки *Catharanthus roseus* разных линий синтезируют различные индолсодержащие алкалоиды, такие как аймалицин, серпентин и катарантин. Конечным ферментом биосинтеза аймалицина является катенаминредуктаза (рис. 8-7). Для превращения катенамина в изомеры аймалицина использовали клетки *C. roseus*, включенные в агарозный гель и обработанные специальным веществом, повышающим проницаемость клеточных мембран [26]. Значения выхода продукта, полученные при использовании различных инкубационных сред, приведены в табл. 8-6. Методика получения аймалицина из катенамина с помощью иммобилизованных клеток *C. roseus* описана в табл. 8-7.

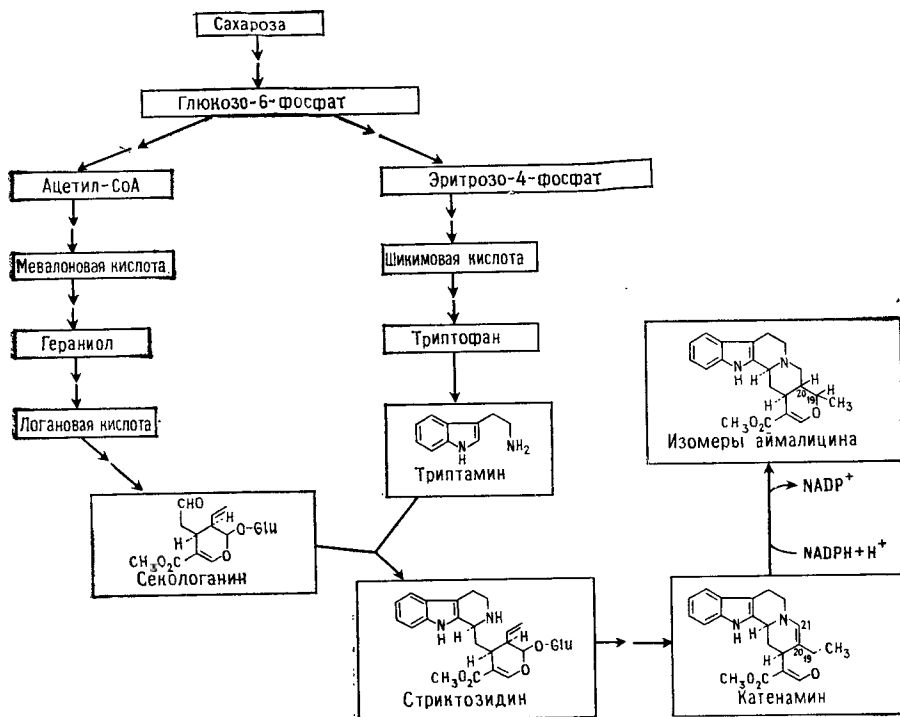


Рис. 8-7. Путь биосинтеза изомеров аймалицина клетками *C. roseus*. Две стрелки между соединениями показывают, что в данном превращении участвуют два или больше фермента. Клетки *C. roseus* синтезируют следующие изомеры: аймалицин (19-βН; 20-βН), 19-эпи-аймалицин (19-αН; 20-βН) и тетрагидроалстонин (19-βН; 20-αН).

Таблица 8-6. Биоконверсия катенамина в изомеры аймалицина с помощью клеток *C. roseus*, включенных в агарозный гель

Инкубационная среда	Относительный выход аймалицина, %
Полная ¹⁾	100
—NADPH + NADP ⁺ + изоцитрат	85
—NADPH + изоцитрат	35
—NADPH	25
—Катенамин	9

¹⁾ 1 г гранул геля с иммобилизованным клетками в 10 мл 50 мМ К-фосфатного буфера, pH 7,5, содержащего 11 мМ катенамин, 1 мМ NADPH и 28 мМ меркаптоэтанол.

Таблица 8-7. Биоконверсия катенамина в аймалицин с помощью иммобилизованных клеток *C. roseus*

1. Клетки *C. roseus* (сырой вес 5 г), обработанные диметилсульфоксидом (10%-ным ДМСО в течение 30 мин), смешать с 5%-ным раствором агарозы (5 г; Sigma, тип VII) при 35 °C.
2. Гранулы геля приготовить по методике В, описанной в табл. 8-3.
3. Гранулы геля с иммобилизованными клетками (1 г) проинкубировать в 10 мл 50 мМ К-фосфатного буфера, pH 7,5, содержащего 28 мМ меркаптоэтанол, а также субстраты в различных комбинациях (табл. 8-6).
4. Для определения степени конверсии катенамина в аймалицин отобрать из инкубационной среды пробы и проанализировать их методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращенной фазе.

4.2. Синтез из предшественников

Если для какого-либо соединения известен путь биосинтеза и доступны вещества-предшественники, то его выход можно существенно увеличить, добавляя эти предшественники в питательную среду. Путь биосинтеза изомеров аймалицина в клетках *C. roseus* детально изучен, и, как видно на рис. 8-7, отдаленными предшественниками этих изомеров являются триптамин и секологанин. Синтез аймалицина из этих соединений с помощью иммобилизованных клеток *C. roseus* описан в работах [9, 23], а методики приведены в табл. 8-8.

Таблица 8-8. Синтез аймалицина с помощью иммобилизованных клеток *C. roseus*

Методика 1

1. Клетки *C. roseus* (сырой вес 10 г) смешать с 2%-ным раствором альгината (10 г; Sigma, тип IV) и приготовить гранулы геля по методике, описанной в табл. 8-1.
2. Гранулы геля с иммобилизованными клетками поместить в колонку.
3. Многократно пропустить через колонку со скоростью 25 мл/ч среду (10 мл), содержащую ¹⁴C-триптамин (25 мкмоль; 233 000 расп./мин на 1 мкмоль) и секологанин (25 мкмоль).
4. Прояснить липофильные продукты реакции из водной фазы, барботируя элюат через хлороформ (10 мл), и затем вновь подать среду на колонку, как показано на рис. 8-8.

Методика 2

1. Клетки *C. roseus* включить в альгинат, агарозу, агар или каррагинан по методикам, описанным выше. Конечная концентрация иммобилизованных клеток для всех препаратов должна составлять 50% (по весу).
2. Иммобилизованные клетки (1,0 г гранул геля) или соответствующее количество суспендированных в среде клеток (контроль) проинкубировать в среде, содержащей ¹⁴C-триптамин (1,25 мкмоль; 400 000 расп./мин на 1 мкмоль) и секологанин (1,25 мкмоль), на качалке (100 об/мин).
3. Через 2 и 5 сут отобрать пробы и определить содержание аймалицина. Результаты представлены в табл. 8-9.

4.3. Синтез de novo

При синтезе de novo сложных органических веществ из простых органических соединений с помощью культивируемых растительных клеток используется большая часть путей клеточного метаболизма. Поэтому синтез de novo осуществим только в том случае, если клетки жизнеспособны. В настоящее время известно

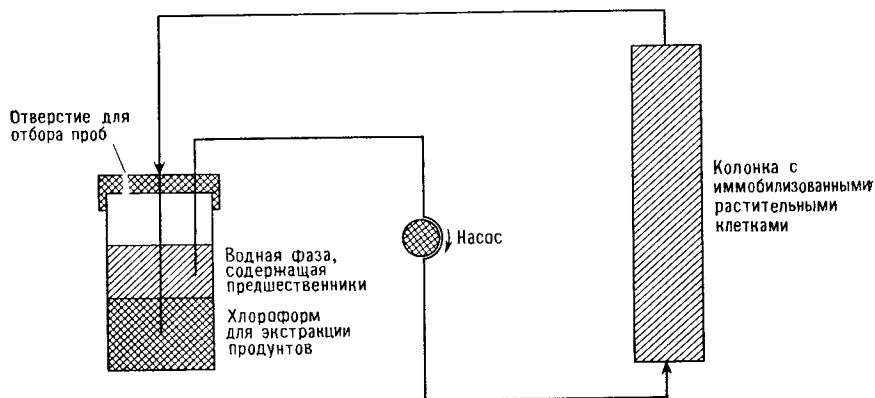


Рис. 8-8. Схема колонного реактора, работающего по замкнутому циклу с постоянной экстракцией липофильных продуктов.

лишь несколько примеров синтеза de novo сложных органических соединений с помощью иммобилизованных растительных клеток. Очевидно, сама по себе иммобилизация практически не влияет на биосинтетическую активность клеток. Ниже описаны два примера синтеза de novo: индолсодержащих алкалоидов и антрахинонов.

Таблица 8-9. Синтез аймалицина из триптамина и секологанина суспендированными в среде и иммобилизованными клетками *C. roseus*

Препарат клеток	Относительный выход продукта, %	
	2 сут	5 сут
Суспендированные в среде	91	100
Включенные в альгинатный гель	125	176
Включенные в агарозный гель	99	114
Включенные в гель агара	81	95
Включенные в гель каррагинана	70	82

4.3.1. Индолсодержащие алкалоиды

Индолсодержащие алкалоиды, такие как аймалицин и серпентин, удалось получить с помощью клеток *C. roseus*, включенных в альгинатный [9, 24] и полиакриламидный [13] гели. Для получения этих алкалоидов были отобраны специальные линии клеток. Пути биосинтеза аймалицина показаны на рис. 8-7.

1. Клетки *C. roseus* включить в альгинатный, агарозный гели или в гели агара и каррагинана, как описано выше.
2. Имобилизованные клетки (1 г гранул) или соответствующее количество суспендированных в среде клеток (контроль) проинкубировать на качалке (100 об/мин) в среде (10 мл), не содержащей гормонов. Использование данной среды обусловлено необходимостью предотвратить быстрый рост клеток, так как

Таблица 8-10. Синтез де novo аймалицина из сахарозы клетками, суспендированными в среде, и иммобилизованными клетками *C. roseus* (относительный выход продукта после 2 нед инкубации)

Препарат клеток	Относительный выход продукта, %
Суспендированные в среде	100
Включенные в альгинатный гель	140
Включенные в агарозный гель	100
Включенные в гель агара	88
Включенные в гель каррагинана	62

это может привести к высвобождению клеток из гранул геля.

3. После 2 нед инкубации отобрать пробы и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращенной фазе определить содержание аймалицина.

Результаты экспериментов приведены в табл. 8-10.

4.3.2. Антрахиноны

Антрахиноны синтезируются различными культурами растительных клеток. Получение антрахинонов с помощью включенных в альгинатный гель клеток *Morinda citrifolia* описано в работе [28]. Было установлено, что в одинаковых условиях иммобилизованные клетки *M. citrifolia* синтезируют в 10 раз больше продукта, чем клетки, суспендированные в среде.

1. Клетки *M. citrifolia* (сырой вес 15 г) смешать с 25 мл 3%-ного раствора альгината (Sigma, тип IV) и 5 мл среды (при этом образуются гранулы).
2. Иммобилизованные растительные клетки (30 гранул) проинкубировать на качалке (100 об/мин) при 23 °C в среде (25 мл), не содержащей гормонов.

3. По мере культивирования отбирать пробы и определять содержание антрахинонов, а также число клеток, иммобилизованных внутри гранул геля.
4. Отобрать гранулы геля из колбы и промыть их.
5. Часть гранул (20 шт) проэкстрагировать 80%-ным этанолом в течение 30 мин, а затем определить спектрофотометрически ($\lambda=434$ нм) количество экстрагированного антрахинона.

Оставшиеся гранулы геля растворяют в 1 М К-фосфатном буфере, pH 6,5 (1,0 мл) и с помощью гемоцитометра определяют число клеток. После 22 сут инкубации количество антрахинона, синтезированного суспендированными в среде и иммобилизованными клетками *M. citrifolia*, составляет 1 и 9,5 пмоль на клетку соответственно.

5. Экскреция продукта из клеток

Очень часто вторичные продукты метаболизма накапливаются внутри культивируемых клеток (в вакуолях), и именно это до некоторой степени ограничивает применение иммобилизованных растительных клеток. Одним из основных преимуществ иммобилизованных биокатализаторов является возможность их длительного использования, но для этого необходимо, чтобы продукт, накопленный внутри клетки, перешел в окружающий раствор. В настоящее время делаются попытки индуцировать экскрецию внутриклеточных продуктов метаболизма из иммобилизованных клеток. Иногда высвобождение продукта из клетки вызывает сама иммобилизация (спонтанная экскреция), но в большинстве случаев необходимо индуцировать экскрецию продукта, добавляя в среду различные вещества (пермеабиллизация).

5.1. Внеклеточные продукты

Ряд продуктов метаболизма растительных клеток выделяется в межклеточную среду. Эти вещества можно получать с помощью иммобилизованных клеток без особых затруднений в реакторе непрерывного действия. Например, как было описано выше, клетки *D. lanata* использовали для конверсии дигитоксина в дигоксин в колоночном реакторе непрерывного действия в течение 70 сут.

5.2. Внутриклеточные продукты

5.2.1. Спонтанная экскреция продукта

В ряде случаев было отмечено, что вещества, которые обычно накапливаются внутри культивируемых клеток, после иммобилизации переходят в межклеточную среду [24, 29]. Именно таким

образом происходит экскреция индолсодержащих алкалоидов из иммобилизованных клеток *C. roseus*. Механизм этой спонтанной экскреции до конца не изучен, но предполагают, что ее вызывает сближение клеток внутри частицы геля [29].

5.2.2. Индуцированная экскреция продукта

Спонтанная экскреция, описанная выше, встречается довольно редко, поэтому в настоящее время разрабатываются методы, с помощью которых можно индуцировать экскрецию желаемого продукта из иммобилизованных клеток [26, 30]. Показано, что индукция высвобождения продукта наблюдается при обработке клеток ДМСО с целью повышения проницаемости клеточных мембран (пермеабиллизации), причем такая обработка не влияет ни на жизнеспособность, ни на биосинтетическую активность иммобилизованных клеток [30]. Поэтому один и тот же препарат иммобилизованных клеток можно использовать для многократной на-

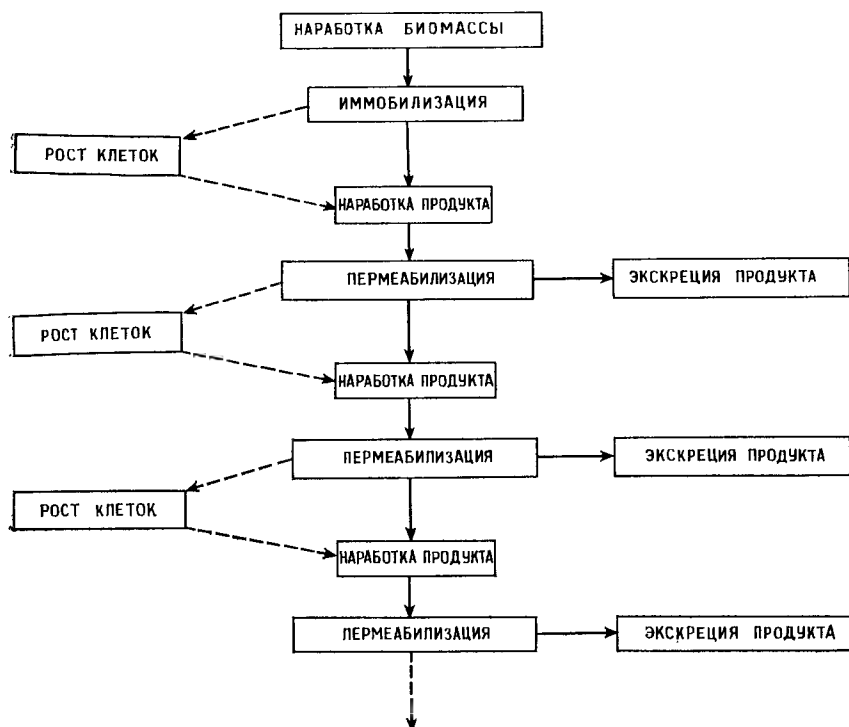


Рис. 8-9. Схема получения органических соединений, синтезируемых в растительных клетках. Она включает периодически индуцируемую экскрецию продукта из иммобилизованных клеток (стадия роста не обязательна).

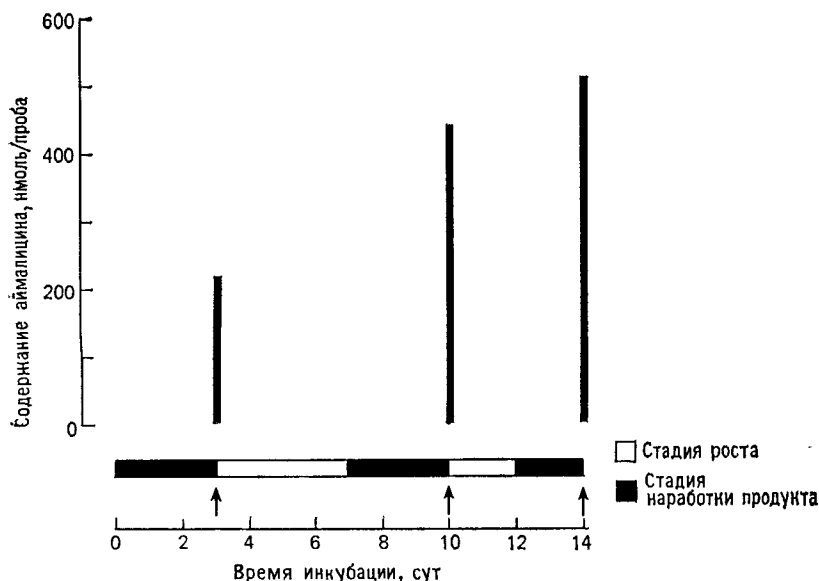


Рис. 8-10. Получение аймалицина из предшественников с помощью включенных в агарозный гель клеток *C. roseus* по схеме, приведенной на рис. 8-9. Для полного высвобождения синтезированного продукта клетки периодически обрабатывали пермеабилizующим агентом (показано стрелками).

работки продукта в циклическом режиме. Данный процесс включает стадию пермеабилizации (рис. 8-9).

1. Клетки *C. roseus* включить в агарозный гель. Конечная концентрация клеток 20% (по весу).
2. Иммобилизованные клетки (2,0 г гранул геля) проинкубировать в реакторе периодического действия в среде (10 мл), свободной от гормонов и содержащей 0,5 мМ ^{14}C -триптамиин (350 000 расп/мин на 1 мкмоль) и 0,5 мМ секологанин, в течение 3 сут при 26 °C.
3. Отобрать гранулы геля, промыть их средой (2×10 мл), а затем поместить на 30 мин в среду, содержащую 5%-ный ДМСО.
4. Обработанные ДМСО гранулы геля промыть средой (2×10 мл), а затем перенести в полную среду (ростовую среду) и инкубировать в течение 2—4 сут.
5. Повторить цикл, включающий наработку продукта и рост клеток.
6. Отобранные среды смешать и проэкстрагировать метиленхлоридом (3×10 мл) при pH 10.
7. Определить в полученных экстрактах содержание меченого

триптамина с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) [9].

Результаты стандартного эксперимента, проведенного по данной методике (рис. 8-10), свидетельствуют о том, что с помощью метода пермеабиллизации можно индуцировать экскрецию продуктов, накопленных внутри иммобилизованных растительных клеток, не нарушая их метаболизма. Следовательно, для получения внутриклеточных продуктов метаболизма растений можно разработать непрерывный процесс, основанный на периодически индуцируемой экскреции продукта.

6. Заключение

Первое сообщение об иммобилизации растительных клеток в гранулированных полимерах появилось в 1979 г. [23], и с тех пор количество подобных работ все растет. Считают, что с помощью иммобилизации можно частично или даже полностью преодолеть ряд основных затруднений, препятствующих крупномасштабному использованию растительных клеток.

После иммобилизации клетки могут еще какое-то время расти, а затем начинается процесс их вымывания из геля, поэтому не рекомендуется использовать включенные в гель растительные клетки для получения веществ, непосредственно связанных с ростом клеток. Иммобилизованные растительные клетки могут быть использованы только для получения веществ, синтез которых не связан с ростом клеток, т. е. веществ, продуцируемых клетками в стационарной фазе. За счет более длительной стационарной фазы, наблюдаемой у иммобилизованных растительных клеток, можно решить ряд проблем, связанных с замедлением роста клеток (наработкой биомассы).

При культивировании растительных клеток происходит их агрегация, причем размеры агрегатов сильно варьируют, что затрудняет как перемешивание культуры, так и процессы массопереноса. Такого рода затруднения можно частично преодолеть с помощью иммобилизации, поскольку при этом агрегация не мешает, а, наоборот, помогает. Относительно гомогенный препарат гранул геля, содержащих клеточные агрегаты, получить нетрудно.

При длительном культивировании, сопровождаемом многократными пересевами, культуры растительных клеток часто претерпевают значительные изменения. Так, линии клеток, отобранные по признаку высокой продуктивности по определенному веществу, во многих случаях утрачивают эту способность. Данная проблема может быть до некоторой степени решена путем иммобилизации, поскольку у иммобилизованных клеток наблюдается удлинение стационарной фазы, а наработка продукта происходит, когда клетки находятся в неделящемся состоянии, т. е. в период наименее вероятного возникновения генетических изменений.

Проблему низкой механической устойчивости растительных клеток удается решить путем включения клеток в защитную полимерную матрицу, благодаря чему упрощается конструкция реактора. Еще одно преимущество иммобилизованных растительных клеток — это возможность индуцированной экскреции веществ, накопленных внутри клетки, с помощью периодической пермеабиллизации, что может оказаться полезным для дальнейшей разработки технологии культивирования растительных тканей. При этом биомассу можно использовать многократно в течение достаточно длительного времени.

Результаты применения иммобилизованных растительных клеток, полученные к настоящему времени, весьма обнадеживают. По-видимому, иммобилизация представляет собой перспективный метод, с помощью которого удастся частично или полностью решить проблемы, связанные с использованием культур растительных тканей для получения сложных органических соединений.

Литература

1. Zenk M. H. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture* (Thorpe T. A., ed.), International Association for Plant Tissue Culture, p. 1, 1978.
2. *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals* (Staba E. J., ed.), CRC Press, Boca Raton FL, 1980.
3. Yamada Y., Fujita Y. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, vol. 1 (Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V. and Yamada Y., eds.), p. 717, Macmillan Publishing Co., New York, 1983.
4. Brodelius P. In: *Advances in Biochemical Engineering*, vol. 10 (Ghose T. K., Fiechter A. and Blakebrough N., eds.), p. 76, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978.
5. *Methods in Enzymology*, vol. 46 (Mosbach K., ed.), Academic Press, New York, 1976.
6. Brodelius P., Mosbach K. In: *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 28, (Laskin A. I., ed.), p. 1, Academic Press, New York, 1982.
7. Brodelius P. In: *Immobilized Cells and Organelles*, vol. 1 (Matthiasson B., ed.), p. 27, CRC Press, Boca Raton, FL, 1983.
8. Brodelius P. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **413**, 383 (1983).
9. Brodelius P., Nilsson K. *FEBS Lett.*, **122**, 312 (1980).
10. Nilsson K., Birnbaum S., Flygare S., Linse L., Schroder U., Jeppsson U., Larsson P.-O., Mosbach K., Brodelius P. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 319 (1983).
11. Freeman A., Aharonowitz Y. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2747 (1981).
12. Rosevear A. *European Patent Application*, 81304001.1, 1981.
13. Galun E., Aviv D., Dantes A., Freeman A. *Planta Med.*, **49**, 9 (1983).
14. Lambe C. A., Rosevear A. *Proceedings of Biotech 83*, London, May 4—6, 1983, p. 565, 1983.
15. Lindsey K., Yeoman M. M., Black G. M., Mavituna F. *FEBS Lett.*, **155**, 143 (1983).
16. Tanaka A., Sonomoto K., Fukui S. *Poster I: 15 presented at 7th International Conference on Enzyme Engineering*, September 25—30, 1983, White Haven, PA, 1983.
17. Fukui S., Tanaka A. In: *Advances in Biochemical Engineering*, vol. 29 (Fiechter A., ed.), p. 1, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1984.
18. Shuler M. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **369**, 65 (1981).
19. Jose W., Pedersen H., Chin C. K. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **413**, 409 (1983).

20. Shuler M., Hallsby A. G. Paper 76b presented at AIChE Summer National Meeting, Denver, Colorado, August 28—31, 1983.
21. Bornman C. H., Zachrisson A. Plant Cell Rep., **1**, 151 (1982).
22. Jirku V., Macek T., Vanek T., Krumphanzl V., Kubanek V. Biotechnol. Lett., **3**, 447 (1981).
23. Brodelius P., Deus B., Mosbach K., Zenk M. H. FEBS Lett., **103**, 93 (1979).
24. Brodelius P., Deus B., Mosbach K., Zenk M. H. European Patent Application 80850105.0, 1980.
25. Alfermann A. W., Bergmann W., Figur C., Helmbold U., Schwantag D., Shuller I., Reinhard E. In: Plant Biotechnology (Mantell S. H. and Smith H., eds.), p. 67, Cambridge University Press, Cambridge, 1983.
26. Felix H., Brodelius P., Mosbach K. Anal. Biochem., **116**, 462 (1981).
27. Zenk M. H. J. Nat. Prod., **43**, 438 (1980).
28. Brodelius P., Deus B., Mosbach K., Zenk M. H. In: Enzyme Engineering, vol. 5 (Weetall H. H. and Royer G. P., eds.), p. 373, Plenum Press, New York, 1980.
29. Rosevear A., Lambe C. A. European Patent Application 82301571.4, 1982.
30. Brodelius P., Nilsson K. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **17**, 275 (1983).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО И КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОРМОНОВ

Стефан П. Бидей

1. Введение

1.1. Имобилизованные клетки млекопитающих

За последние годы были достигнуты большие успехи в разработке методов контролируемого культивирования *in vitro* клеток млекопитающих. Можно выделить несколько факторов, непосредственно способствовавших быстрому развитию этой области биотехнологии, а именно: получение непрерывных, полностью охарактеризованных клеточных линий, обнаружение специфических факторов роста и разработка аппаратуры, предназначенной для культивирования изолированных клеток в оптимальных условиях *in vitro*. В результате в настоящее время появилась возможность поддерживать в культуре в состоянии высокой функциональной дифференциации практически любой тип клеток млекопитающих. Быстрая эволюция методологии культивирования клеток оказала огромное влияние на научные исследования во многих областях биологии. В частности, методики выделения и изучения продуктов клеточного метаболизма, таких как гормоны, ферменты и антитела, постоянно упрощаются и совершенствуются.

В зависимости от того, есть ли необходимость в прикреплении изолированных животных клеток к твердой подложке, или матрице, используют две различные методики культивирования. Большинство клеток твердых тканей, таких как ткани почки, печени и кожи, являются поверхностно-зависимыми, поэтому *in vitro* их можно культивировать только в виде тонких пластов или монослоев, непосредственно связанных с поверхностью подложки. Отдельные клетки, образующие такой монослой, контактируют как с соседними клетками, так и с самой подложкой; следовательно, их можно рассматривать как имобилизованные. Однако в отличие от иммобилизации ферментов, антител и микробных клеток, для которой часто требуется предварительная химическая модификация, связывание между поверхностно-зависимыми клетками млекопитающих и твердой подложкой обычно проводят без специальной физической или химической обработки. Оно осуществляется благодаря исходной активности препарата изолированных клеток, совместимости клеток с твердой подложкой, а также наличию в сыворотке веществ, способствующих связыванию клеток или специально добавленных в среду.

Для некоторых видов клеток (например, клеток лимфобластоидного происхождения), обладающих особыми свойствами, разработана другая система культивирования. Такие клетки можно выращивать в условиях, сходных с условиями, в которых происходит пролиферация бактериальных клеток. Они растут и размножаются в суспензии без предварительной иммобилизации, что в значительной степени облегчает разработку промышленных способов их культивирования. При культивировании поверхностно-зависимых клеток требуется большая площадь поверхности носителя, а также адекватное и строго контролируемое поступление питательных веществ и кислорода, что вплоть до последнего времени сдерживало их широкомасштабное применение. Благодаря разработке методов культивирования на микроносителях, согласно которым клетки выращивают в виде монослоев, иммобилизованных на гранулах полистирола, стекла или декстрана, стало возможным культивирование поверхностно-зависимых клеток в суспензии. Однако, чтобы перейти к промышленному выращиванию клеток данным способом, необходимо еще решить ряд проблем, связанных с контролем условий культивирования.

Иммобилизованные поверхностно-зависимые клетки играют все большую роль во многих областях биологии, в частности в клинических исследованиях. Применение таких препаратов в значительной мере способствовало формированию сегодняшних представлений о регуляции роста и дифференцировки клеток, изучению процесса старения клеток, а также установлению функциональных и морфологических различий между нормальными и опухолевыми клетками. Иммобилизованные клетки обычно сохраняют высокую степень функциональной дифференцировки, что облегчает изучение регуляции клеточного метаболизма гормонами и ростовыми факторами, а также исследование модификации клеточных функций под действием лекарственных препаратов и токсинов. Так, иммобилизованные гепатоциты нашли широкое применение в исследованиях метаболизма чужеродных веществ в печени. Однако большинство работ с ними носило приближенно-качественный характер, и только благодаря быстрому развитию в последнее время биотехнологии клеточных культур стало возможным использовать иммобилизованные монослои клеток в биотестах — высокочувствительных специфичных системах, предназначенных для количественного определения ряда биологически важных веществ. Так, в клинической и экспериментальной эндокринологии использование биотестов *in vitro* облегчает определение гормонов как в здоровом, так и в больном организме и стимулирует исследования биосинтеза и метаболизма гормонов, а также ответа клетки на их воздействие.

1.2. Биотест: общие представления

Качественное и количественное определение гормонов может основываться как на структурных, так и на функциональных особенностях их молекул. В зависимости от этого выделяют две основные группы методов. К первой группе относятся методы определения и распознавания различных молекулярных форм гормонов; их называют структурно-специфическими [1], поскольку они основываются на специфичности связывающих белков, находящихся в норме в организме, или антител, экспериментально индуцированных к определенной молекулярной конформации какого-либо гормона. Методы, основанные на анализе взаимодействия гормон—антитело (наиболее известным и широко распространенным среди них является метод радиоиммунологического анализа), предназначены для определения количества гормона, т. е. числа молекул данной структуры в опытном образце по сравнению со стандартным, для которого известно содержание исследуемого вещества. Однако необходимо отметить, что при определении гормонов структурно-специфическими методами не учитывается их биологическая эффективность, и, следовательно, невозможно различить биологически активные и неактивные формы гормонов.

В отличие от радиоиммунологического анализа и сходных с ним методов, в основе которых лежит структурно-специфическое определение гормонов путем сравнения со стандартным препаратом, биотесты относятся к функционально-специфическим методам, основанным на сравнении действия различных веществ (например, гормонов или ферментов), выполняющих одну и ту же физиологическую функцию. На практике при биотестировании сравнивают величины ответа ткани-мишени после инкубации с тестируемым или контрольным стимулятором, причем оба стимулятора должны обладать одинаковой специфичностью к испытуемой ткани-мишени. Основные принципы, лежащие в основе метода биотестирования, иллюстрирует рис. 9-1. Необходимо отметить, что величина специфического ответа клеточной культуры на действие стимулятора пропорциональна количеству занятых рецепторов клеточной поверхности и, следовательно, зависит от «концентрации» биологически активного вещества в пробе, действию которого подвергают ткань-мишень. Благодаря функциональной специфичности ответа ткани-мишени она будет «узнавать» только молекулы, обладающие по отношению к ней определенной биологической активностью, в то время как другие молекулы, даже с очень сходной структурой, никакого ответа в клетках-мишенях не вызовут и, следовательно, не будут определены с помощью данного биотеста. Вместе с тем при использовании структурно-специфических методов не удастся отличить близкие

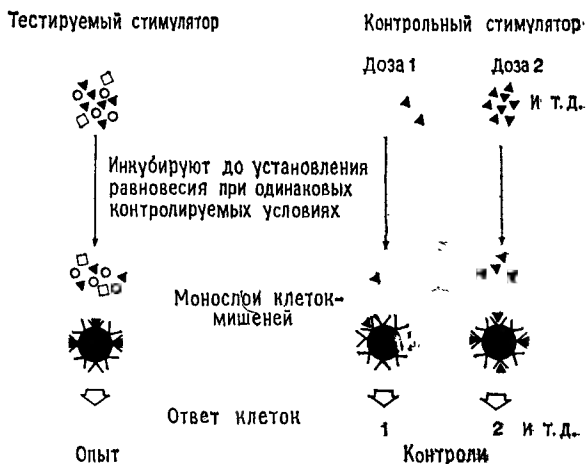


Рис. 9-1. Биотест на специфический стимулятор в гетерологичной по лиганду популяции, основанный на определенном функциональном ответе клеток, которые иммобилизованы в виде монослоя и используются в качестве ткани-мишеней.

по структуре молекулярные формы от биологически интактных молекул.

Последовательное развитие методов получения и сохранения *in vitro* тканей-мишеней, реагирующих на ряд биологически активных веществ, способствовало разработке специфических систем для определения *in vitro* биологической активности, или эффективности, гормонов в сыворотках или других биологических жидкостях. В связи с этим стал возможным комплексный анализ ряда гормонов с помощью как структурно-специфических, так и функционально-специфических методов, что позволило при определенных заболеваниях выявлять различия в биологической активности и количестве (т. е. удельной активности) гормонов в здоровом и больном организме. Совершенно очевидно, что в экспериментальной клинической медицине необходимо применять и структурно-специфические и функционально-специфические методы анализа.

При написании данной главы преследовались три основные цели. Во-первых, познакомить читателя с основными критериями и принципами, используемыми при разработке и конструировании систем для биотестирования гормонов; эти системы основаны на функциональном ответе клеток, иммобилизованных в виде монослоя на твердой подложке. Во-вторых, дать исследователям, работающим в данной области, практическое руководство по методам, используемым в последнее время в нашей лаборатории, а именно: выделению и иммобилизации клеток, а также постановке и проведению простейших биотестов, которые основаны на применении

иммобилизованных первичных культур клеток, полученных из целых тканей. И наконец, в-третьих, здесь обсуждается необходимость соответствующего и адекватного контроля при проведении биотеста и описаны простейшие способы его реализации.

2. Иммобилизованные клетки в качестве тканей-мишеней в биотестах

Быстрое развитие прогрессивных методов получения изолированных клеток, а также способов их сохранения *in vitro* в значительной степени облегчило эволюцию методов биотестирования, основанных на ответе культивируемых клеток. Во многих отношениях использование иммобилизованных клеток для биотестирования гормонов в биологических жидкостях или экстрактах тканей можно рассматривать как естественный переход от ранее применявшихся более трудоемких и менее точных методов культивирования целых органов или кратковременного культивирования клеток в суспензиях. В других случаях биотесты с применением иммобилизованных клеток пришли на смену биотестам, которые проводили *in vivo* на лабораторных животных, причем методики биотестирования при этом значительно усовершенствовались и сильно упростились.

2.1. Подложки для иммобилизации клеток

Длительность жизни, пролиферация и функциональная стабильность клеток, полученных ферментативным диспергированием тканей, в большой степени зависит от взаимодействия клеток с твердой подложкой, или матрицей для роста. Поэтому необходимо, чтобы методы культивирования и свойства подложки соответствовали оптимальным адгезионным свойствам клеток. Традиционно используемые стеклянные сосуды и чашки Петри мало пригодны для культивирования животных клеток, в связи с чем в последнее время нашли широкое применение одноразовые полистирольные платы и чашки, предварительно стерилизованные гамма-лучами. Кроме того, благодаря прекрасным оптическим свойствам полистирола иммобилизованные клетки очень удобно наблюдать в фазово-контрастный микроскоп.

Все клетки, полученные из тканей позвоночных, обладают отрицательным поверхностным зарядом, поэтому для их успешной иммобилизации подходят стеклянные или полистирольные подложки с отрицательно заряженной поверхностью, или же подложки, поверхность которых покрыта полилизинном и обладает положительным зарядом. В любом случае связывание клеток в большей степени зависит от плотности заряда, чем от полярности. Чтобы обеспечить прочное прикрепление клеток разных видов, поверхность подложек для иммобилизации предварительно специ-

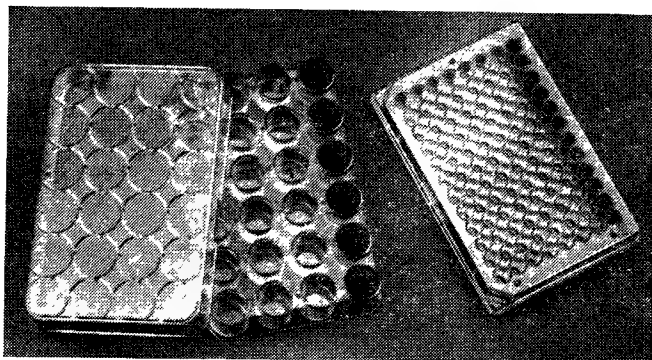


Рис. 9-2. Полистирольные платы, используемые для культивирования в монослое иммобилизованных клеток-мишеней. Слева: 24-луночная плата для микротитрования, площадь культивирования $1,9 \text{ см}^2$ на лунку (Linbro, Flow Laboratories Limited). Справа: 96-луночная плата для микротитрования, площадь культивирования $0,32 \text{ см}^2$ на лунку (Gibco-European Limited). Поверхности лунок специально обработаны для обеспечения оптимального прикрепления клеток.

ально обрабатывают. На рис. 9-2 показаны наиболее широко используемые полистирольные платы двух типов с плоскодонными лунками. Одна из плат имеет 24 лунки, а другая — 96. Плата последнего типа пригодна для биотестов, в которых после стимуляции берут на анализ только инкубационную среду, поскольку повторное использование клеток в этом случае практически невозможно из-за малых размеров лунок.

2.2. Иммобилизация клеток

Иммобилизация поверхностно-зависимых клеток на твердой подложке — процесс многоступенчатый, который обычно начинают с адсорбции на отрицательно заряженной поверхности подложки специальных веществ, способствующих прикреплению клеток. К таким веществам относятся гликопротеины, получаемые либо из сыворотки, либо из клеток определенных типов, например диплоидных фибробластов, часто встречающихся в виде примесей в первичных культурах эпителиальных клеток. Кроме того, из эпителиальных клеток выделяют особые факторы связывания, которые осуществляют прикрепление клеток к подложке, связывая гликопротеины клеточной поверхности с предварительно адсорбированными сывороточными или фибробластными гликопротеинами. Таким образом, иммобилизация клеток достигается благодаря этому первоначальному контакту и последующему распластыванию клеток по поверхности, в результате чего формируется монослой (рис. 9-3). Итак, образование

ГС: гликопротеины сыворотки
 ГКП: гликопротеины клеточной поверхности
 ФС: факторы связывания

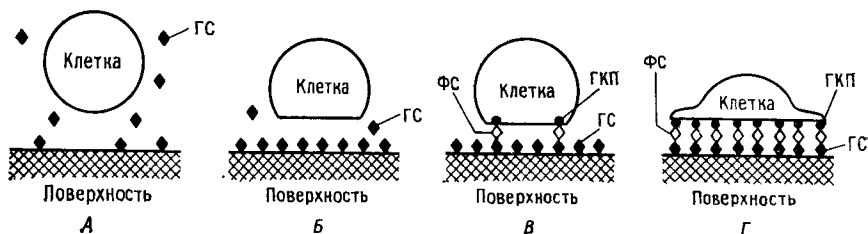


Рис. 9-3. Прикрепление и организация в монослой свежеприготовленных изолированных клеток. *А.* Молекулы гликопротеина (темные ромбики), полученного из культуральной среды, обогащенной сывороткой, адсорбируются на поверхности лунки платы для культивирования благодаря эффекту заряженной поверхности. *Б.* Клетки, полученные из целой ткани, оседают на поверхность лунки через 1—2 ч после нанесения. *В.* Факторы связывания (ФС) (светлые ромбики), полученные из клеток, осуществляют прикрепление клеток к поверхности лунки, связывая сывороточные гликопротеины (ГС) с гликопротеинами клеточной поверхности (ГКП) (темные кружки). *Г.* Через ~24 ч иммобилизованные клетки распластаются по поверхности подложки, образуя монослой.

тесной связи между поверхностью клетки и подложкой и по существу структурная и функциональная стабильность монослоя в большой степени зависят от присутствия в среде гликопротеинов, способствующих прикреплению клеток [2].

2.3. Свойства клеток после иммобилизации

Иммобилизация на твердой подложке клеток, реагирующих на действие гормонов, создает идеальные условия для выполнения различных операций, проводимых при биотестировании. Так, значительно упрощаются процедуры введения и удаления тестируемого и контрольного стимуляторов. При этом клеточный монослой практически не нарушается, а «перенос» культуральной среды между инкубационными стадиями сведен до минимума. Экскретируемые клеткой вещества можно легко определять, отбирая через определенные промежутки времени культуральную среду и анализируя ее, в то время как внутриклеточные продукты метаболизма можно выделять и изучать после полного лизиса клеток и их обработки специальными реагентами. И наконец, уникальная пространственная конфигурация клеток, организованных в монослой, способствует быстрому и одновременному действию стимулятора на все клетки культуры, благодаря чему достигается почти одинаковый ответ всех клеток. К тому же если повторы культур структурно идентичны, то с помощью иммобилизованных клеток удастся достичь высокой чувствительности биотестирования.

2.4. Выбор клеток-мишеней для биотестов

Выбор клеток-мишеней, наиболее подходящих для биотеста на какой-либо определенный гормон, обуславливается как природой исследуемого гормона, так и стабильностью *in vitro* и характеристиками ответа используемых клеток. Конечной целью разработки биотестов является получение доступных штаммов клеток для непрерывного культивирования или стабильных клеточных линий, у которых в течение длительного времени характеристики ответа и роста постоянны. Такие линии отвечают требованиям, предъявляемым к идеальным тканям-мишеням. Однако во многих случаях еще не удалось выделить культуры клеток для непрерывного культивирования, и разработанные к настоящему времени системы биотестирования основываются на использовании клеток, полученных непосредственно из человеческих или животных тканей путем ферментативного диспергирования. Как правило, эти клетки выделяют из соответствующих естественных тканей-мишеней, реагирующих на определенный гормон *in vivo*, и поэтому в идеале их нужно получать из тканей тех же видов животных, что и тестируемый гормон. В биотестах на человеческие клеточные стимуляторы, т. е. гормоны, выполнить это требование достаточно трудно, поскольку часто нет возможности получить подходящие образцы тканей для приготовления клеточных препаратов, особенно в случае непатологических тканей. В связи с этим для проведения какого-либо определенного биотеста нередко приходится использовать животные ткани. Однако это можно делать только после тщательного и систематического изучения и сравнения специфичности взаимодействия и характеристик ответов человеческих и животных клеток-мишеней на разные дозы стандартного препарата гормона.

Изолированные клетки, полученные непосредственно из целых тканей ферментативным диспергированием, можно поддерживать в первичной культуре в иммобилизованном состоянии в течение 10—14 сут. При этом они способны сохранять высокую специфичность и чувствительность по отношению к соответствующим стимуляторам, т. е. свойства, предопределенные *in vivo* функциональными характеристиками исходной ткани. В биотестах на ряд гормонов появилась возможность использовать первичные культуры клеток, правда, их применение лимитируется ограниченной продолжительностью жизни клеток и присутствием отдельным клеточным препаратам вариабельностью ответа. К сожалению, функционально дифференцированные клетки в первичных культурах теряют многие из функционально специфических маркеров, причем иногда этот процесс сопровождается интенсивным ростом быстро пролиферирующих типов «примесных» клеток, например фибробластов. Однако период, в

течение которого клетки-мишени способны отвечать на действие стимулятора, можно продлить, селективно уменьшив скорость пролиферации фибробластов. Этого добиваются, варьируя состав культуральной среды: уменьшая содержание сыворотки или полностью исключая ее из состава среды и подбирая определенные факторы роста и факторы, способствующие прикреплению клеток [3—6].

Давно установлено, что *in vivo* функциональные характеристики чувствительных к гормонам тканей зависят не только от возраста и пола, но также от состояния здоровья и условий питания животного. Поэтому отнюдь не удивительно, что первичные монослои, приготовленные из таких тканей, характеризуются вариабельностью ответа клеток на действие стандартного препарата тестируемого стимулятора, что обусловлено характеристиками ответа *in vivo* различных исходных тканей [7]. В сущности каждый отдельный препарат иммобилизованных клеток представляет собой ткань-мишень для биотеста, однако широкое применение таких препаратов ограничено тем, что необходимо часто готовить новые монослои из свежих тканей, поскольку жизнь изолированных клеток непродолжительна и способность первичных культур к ответу на действие стимулятора постепенно уменьшается. Их используют лишь в тех случаях, когда одинаковая способность клеток к ответу не обязательна. Как уже указывалось выше, применяя штаммы клеток для непрерывного культивирования или устойчивые клеточные линии, можно решить большинство проблем, связанных с разработкой и внедрением в практику стабильных и воспроизводимых биотестов, основанных на использовании первичных клеточных культур. По определению такие штаммы и линии способны к неограниченной пролиферации, а в случае функционально дифференцированных чувствительных к гормону клеток характеризуются стабильным ответом на действие определенного специфического стимулятора. Это позволяет преодолеть затруднения, связанные с ограниченной продолжительностью жизни первичных культур и уменьшением их способности к ответу на действие гормона.

2.5. Выбор соответствующего ответа клеток

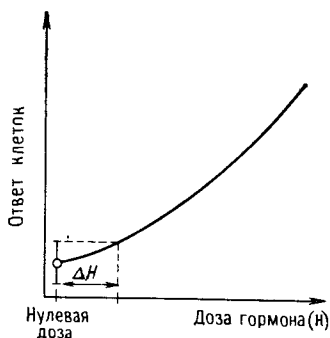
В результате взаимодействия между гормоном и специфичными к действию данного стимулятора рецепторами соответствующих клеток-мишеней в нормальных условиях *in vivo* происходят изменения в клеточном метаболизме: накапливаются метаболиты, расходуются вещества-предшественники, экскретируются в межклеточную среду специфические продукты метаболизма. Однако после извлечения тканей-мишеней из организма и ферментативного диспергирования изолированные клетки нередко теряют ряд специфических функциональных свойств, характерных для ин-

тактной ткани, и поэтому препараты иммобилизованных клеток не всегда способны продемонстрировать полную последовательность функциональных ответов, обычно возникающих при гормональной стимуляции исходной ткани. Тем не менее во многих случаях степени дифференцировки, сохраняющейся в условиях *in vitro*, бывает достаточно, чтобы выбрать несколько специфичных, ярко выраженных ответов клеток, на основе которых можно разработать метод биотестирования данного гормона.

При изучении различных метаболических ответов, а также при выборе оптимального для разработки метода измерения биологической активности данного гормона следует оценивать каждый из ответов по следующим четырем критериям: 1) специфичность и 2) чувствительность ответа, характерные для данного препарата клеток, 3) точность определения в выбранном интервале доз гормона, 4) воспроизводимость ответа при использовании различных клеточных препаратов. Более того, поскольку каждый метаболический ответ должен быть количественным, при объективной оценке ответов клетки на действие изучаемого гормона большое значение имеет простота и эффективность способов выделения каждого метаболита, а также характеристики методов его определения, таких как радиоиммунологический анализ или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Прежде всего необходимо изучить *специфичность* выбранного ответа клеток-мишеней на действие данного стимулятора. Не исключено, что действие других гормонов, особенно гормонов, имеющих сходную с исследуемым структуру, может вызывать подобный ответ. Например, такие гликопротеиновые гормоны, как лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреотропный гормон (ТТГ) и хорионический гонадотропный гормон человека (ХГТЧ) имеют идентичные α -субъединицы и, как и предполагалось, обладают перекрестной активностью при взаимодействии с ТТГ-рецепторами [8]. Однако в большинстве случаев уровень функциональной перекрестной активности или простой блокировки рецепторов структурно сходными, но биологически неактивными молекулами можно свести до минимума, тщательно подбирая клетки-мишени и условия их инкубации, при которых достигается высокий уровень специфичности функционального ответа на действие исследуемого стимулятора.

Следующий фактор, который необходимо принимать во внимание при оценке различных ответов иммобилизованных клеток-мишеней — это *чувствительность* ответа. Практически это означает, что следует установить минимальную дозу гормона, которую измеряют с помощью данного метода регистрации ответа клеток. Чувствительность ответа определяют как наименьшее количество стимулятора, которое удастся отличить от нулевой дозы при заданных условиях биотеста; его находят, построив для исследуемого гормона кривую доза—ответ (рис. 9-4). Можно установить,

Рис. 9-4. Определение чувствительности биотеста по стандартной кривой доза — ответ. Чувствительность биотеста (ΔH) — это абсолютная ошибка определения действия гормона при его нулевой дозе, которая является функцией как наклона кривой доза — ответ, так и ошибки определения величины ответа клеток (т. е. SD) при нулевой дозе гормона.



как влияют на чувствительность биотеста изменения условий инкубации, таких как плотность клеток-мишеней в монослое, время действия стимулятора, ионная сила и pH среды, а также выбрать условия, в которых чувствительность проводимого биотеста максимальна. Точность измерения действия гормона, или показатель эффективности анализа, определяют по графикам зависимости точности измерения от дозы гормона [9]. Эти графики можно использовать для сравнения эффективности биотеста в различных интервалах доз исследуемого гормона, т. е. на различных участках стандартной кривой, а также для изучения влияния различных условий инкубации или каких-либо веществ на эффективность биотеста в любом заданном интервале доз гормона. При оптимизации условий проведения биотеста следует стараться подобрать условия для наиболее точного определения действия гормона, по крайней мере в интересующем, а желательно в максимально широком интервале доз. Подобный метод анализа кривой доза — ответ первоначально использовали для анализа кривых насыщения [9]. Аналогичный, хотя и немного упрощенный, подход был затем применен для оптимизации и оценки методов биотестирования стимуляторов щитовидной железы, основанных на ответах *in vitro* срезов ткани щитовидной железы и клеточных мембран [10] или первичной культуры клеток щитовидной железы в монослое [7, 11].

Последний фактор, который необходимо учитывать при оценке различных функциональных ответов клеток-мишеней, — это воспроизводимость биотеста от опыта к опыту. Используя отдельные монослои клеток, полученные из одной и той же исходной ткани, в различных, но следующих один за другим биотестах можно достичь хорошей воспроизводимости, при которой отклонения между биотестами не превышают 10—15% для доз гормона, входящих на участок максимальной точности кривой доза — ответ. Сходный по воспроизводимости ответ должны давать последовательные субкультуры стабильных клеточных линий. Однако

для первичных культур, полученных из различных исходных тканей, это редко удается из-за вариабельности их способности к ответу. В таких случаях отклонения между биотестами достигают зачастую 40—50% [7].

Подводя итог, следует подчеркнуть, что окончательно выбранный для определения какого-либо гормона ответ монослоев клеток-мишеней должен соответствовать следующим критериям:

1. Быть высокоспецифичным по отношению к исследуемому гормону.
2. Обладать высокой чувствительностью.
3. Обеспечивать достаточную точность определения гормона в необходимом интервале доз.
4. Обеспечивать высокую воспроизводимость как внутри каждой культуры клеток, так и (насколько это возможно в случае первичных монослоев) между препаратами клеток, полученными из различных исходных тканей.

3. Получение и иммобилизация изолированных клеток

Теперь, когда мы познакомились с некоторыми основными положениями, касающимися выбора клеток-мишеней, условий их иммобилизации и инкубации, а также ответа клеток, наиболее подходящего для биотестирования *in vitro* какого-либо гормона, рассмотрим в деталях практические методы получения, иммобилизации и сохранения жизнеспособных функционально-чувствительных клеток, полученных из целых тканей, и их последующего использования в биотестах. При написании данного раздела мы предполагали, что читатель знаком с основными методами культивирования клеток и специальной терминологией. Тем, кто впервые знакомится с данным вопросом, можно рекомендовать работы [12, 13]. Ниже будут рассмотрены основные методики получения, культивирования и иммобилизации животных клеток для биотеста ТТГ, основанного на накоплении циклического АМР (сАМР) монослоем иммобилизованных клеток щитовидной железы человека.

3.1. Получение из целых тканей клеток, чувствительных к действию гормона

Жизнеспособные, чувствительные к действию гормона клетки можно выделить либо из нормальных (например из образцов, взятых на биопсию), либо из патологических тканей человека или же из аналогичных тканей животных. В любом случае изолированные клетки получают, подвергая образцы тканей ферментативному диспергированию. При этом, чтобы избежать некроза и получить максимальный выход жизнеспособных клеток, ткань следует измельчать как можно быстрее. Все операции с тканями

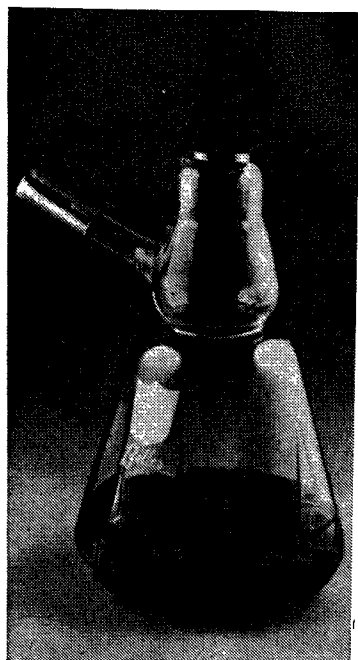


Рис. 9-5. Сосуд для обработки тканей трипсином (Bellco Glassware Inc.), используемый для ферментативного диспергирования кусочков ткани с целью получения клеточной суспензии. Боковая отводная трубка служит для декантации клеточной суспензии и обеспечивает минимальное взбалтывание оставшихся частиц ткани.

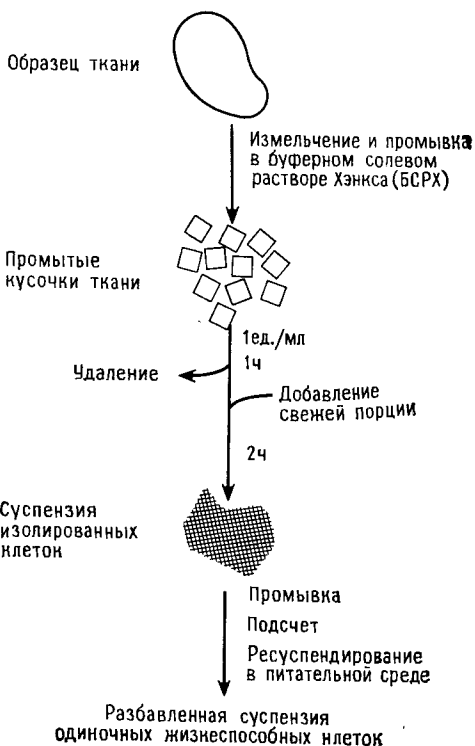


Рис. 9-6. Схема приготовления суспензии изолированных жизнеспособных клеток из свежеполученного образца ткани.

или клетками, описанные в данном разделе, следует проводить в стерильных условиях.

3.1.1. Измельчение и ферментативное разрушение тканей

Образцы тканей человека или животных до начала обработки можно хранить в сухом стерильном контейнере при комнатной температуре в течение очень короткого времени (не более 1 ч). При этом потеря жизнеспособности клеток при получении препарата минимальна. Измельчение тканей перед ферментативным

**Таблица 9-1. Предварительная обработка
и ферментативное диспергирование тканей**

Предварительная обработка тканей

1. После удаления соединительной ткани из исследуемого гистологического препарата нарезать его на кубики с ребром 2—3 мм и поместить в химический стакан объемом 100 мл.
2. С помощью пинцета и изогнутых ножниц с острыми концами измельчить ткань до получения частиц размером 0,5—1,0 мм. Во время этой процедуры измельченную ткань периодически промывать порциями по 20 мл теплого (37 °C) солевого раствора Хэнкса, свободного от ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} и не содержащего фенолового красного.
3. Измельченную ткань промывать путем декантации 4—5 раз до тех пор, пока из супернатанта не исчезнут свободные эритроциты и остатки соединительной ткани. Промытую измельченную ткань ресуспендировать в свежем солевом растворе Хэнкса из расчета 10 мл раствора на 1 г исходной ткани.

Ферментативное диспергирование измельченной ткани

1. Промытую измельченную ткань перенести в стерильную колбу для обработки трипсином. Специальные колбы для этой цели выпускает, например, фирма Bello Glass Inc. (Вайнлэнд, Нью-Джерси, США) (рис. 9-5). В колбу добавить стерильный раствор ферментного диспергирующего препарата. Наиболее подходящим для этой цели является препарат «Disperse II» (Boehringer-Mannheim, 1 ед./мл в солевом растворе Хэнкса), который следует добавлять из расчета 10 мл препарата на 1 г измельченной ткани.
2. В колбу поместить стерильный магнит, плотно закрыть ее и инкубировать при 37 °C на магнитной мешалке (100—150 об/мин).
3. Через 1 ч колбу снять с мешалки и после полного оседания измельченной ткани надосадочную жидкость, которая содержит оставшиеся эритроциты, а также эндотелиальные клетки и клетки соединительной ткани, слить через боковую отводную трубку.
4. К осадку добавить аликвоту свежего подогретого раствора фермента и вновь инкубировать на мешалке в течение 1—2 ч. На этой стадии ферментативного диспергирования препарат очень незначительно «загрязнен» клетками неэпителиального происхождения, поэтому высвобожденные клетки можно отделить центрифугированием (100 g, 7 мин) при комнатной температуре.

Последующая обработка диспергированных клеток

1. Осадок, состоящий из изолированных клеток, полученных после ферментативного диспергирования измельченной ткани, ресуспендировать в подогретом (37 °C) солевом растворе Хэнкса (20 мл). Для перемешивания можно использовать силиконизированную пастеровскую пипетку.
2. После образования гомогенной суспензии вновь осадить клетки центрифугированием (100 g, 7 мин).
3. Супернатант удалить, а осадок ресуспендировать в 20 мл подогретого солевого раствора Хэнкса, как описано выше.

диспергированием обычно начинают с приготовления срезов толщиной 0,5—1,0 мм, например, с помощью микротомы Стади—Ритгса (в Великобритании поставляется фирмой Arnold R. Horwell and Company, Лондон). В нашей лаборатории успешно при-

Таблица 9-2. Определение плотности клеточной суспензии и жизнеспособности клеток

1. В небольшую стеклянную или полистирольную пробирку в стерильных условиях внести равные объемы (100—200 мкл) клеточной суспензии и 0,4%-ного (вес/объем) раствора трипанового синего, хорошо перемешать и оставить на 2—3 мин.
2. Небольшое количество смеси перенести в камеру гемоцитометра и поместить в поле зрения микроскопа. На бледно-голубом фоне мертвые клетки выглядят темно-синими, а жизнеспособные клетки остаются бесцветными.
3. В центральной части сетки гемоцитометра подсчитать число жизнеспособных клеток и выразить его в процентах по отношению к общему числу клеток, чтобы оценить как выход клеток, так и их жизнеспособность. Число жизнеспособных клеток должно быть не менее 80—90%.
4. Перед внесением клеточной суспензии в лунки плат развести ее соответствующей питательной средой до требуемой плотности.

меняют более простой способ измельчения — с помощью ножниц и пинцета (табл. 9-1). Промытую измельченную ткань затем подвергают контролируемому ферментативному диспергированию с помощью трипсина в специальной колбе (рис. 9-5), получая таким образом суспензию жизнеспособных клеток.

3.1.2. Определение выхода и жизнеспособности клеток

Непосредственно перед иммобилизацией определяют плотность популяции клеток и оценивают их жизнеспособность. В обоих случаях это делают с помощью гемоцитометра под микроскопом при небольшом увеличении ($\times 10$), как описано в табл. 9-2.

Последовательность операций при получении из целых тканей изолированных жизнеспособных клеток схематически представлена на рис. 9-6.

3.2. Иммобилизация клеток в виде монослоев

3.2.1. Получение повторов культур

После получения суспензии изолированных клеток из исходной ткани, чувствительной к исследуемому стимулятору, можно приготовить повторы монослоев, которые в дальнейшем используют в качестве тканей-мишеней для биотеста. Для этого в нужное число лунок вносят требуемое количество исходной клеточной суспензии. Чтобы обеспечить высокую точность биотеста, необходимо добиться максимальной идентичности повторов монослоев. Этого достигают, внося исходную клеточную суспензию в лунки с помощью пипетки с фиксированным объемом и используя одноразовые колпачки, предварительно стерилизованные в автоклаве. Предполагают, что клетки в суспензии распределены равномерно

и остатки ткани и клеточные агрегаты отсутствуют; в этих условиях можно получить монослой культуры с плотностью клеток, варьирующей в пределах 1—2%. Функционально дифференцированные клетки в первичных культурах часто обладают ограниченной способностью к непрерывной пролиферации, поэтому, если необходимо, чтобы сразу же после иммобилизации монослой имел желаемую «рабочую» плотность, в каждую лунку нужно внести достаточное количество клеток. При использовании 24-луночной платы (рис. 9-2) рекомендуется вносить в каждую лунку приблизительно $5 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл культуральной среды. При более высокой концентрации клеток ответ культуры на стимулирующее действие определяемого гормона не достигает максимального значения, что можно объяснить постепенным уменьшением количества доступных гормональных рецепторов в результате скученности и избыточного роста клеток.

Приготовив требуемое количество повторов культур, платы помещают в инкубатор (37 °C) в атмосферу «воздух + 5% CO₂», а при использовании среды, забуференной ГЭПЭС (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновой кислотой), — в воздушную атмосферу. В любом случае атмосфера в инкубаторе должна быть насыщена водяными парами, чтобы избежать испарения культуральной среды.

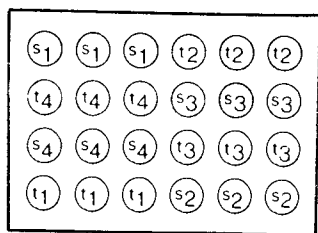
3.2.2. Обработка клеток после иммобилизации

Каждые 3—4 сут среду удаляют с поверхности монослоев культур с помощью стерильной пастеровской пипетки, соединенной с ловушкой и вакуумным насосом, и добавляют предварительно нагретую свежую порцию той же среды. Необходимо внимательно следить, чтобы при смене среды монослой не высыхал. Как правило, клетки, иммобилизованные в первичных культурах вышеописанным способом, используют для биотеста в течение 7—10 сут после начала культивирования в монослоях, т. е. в период, когда способность клеток реагировать на действие гормона максимальна.

4. Обработка иммобилизованных клеток тестируемыми стимуляторами

4.1. Проведение биотеста: основные принципы

Повторы монослоев клеток, полученные из одной и той же исходной ткани или одного и того же посева клеток, в отличие от лабораторных животных, кусочков или срезов ткани можно считать абсолютно идентичными по их способности реагировать на действие определенной дозы стимулятора. Следовательно, основ-



t1-t4: дозы тестируемого стимулятора 1-4

s1-s4: дозы стандартного стимулятора 1-4

Рис. 9-7. Распределение тестируемого и контрольного стимуляторов на плате с иммобилизованными клетками. В данном случае каждую дозу стимулятора вносили в три лунки, содержащие клеточные монослои, т. е. на стандартной 24-луночной плате размещали восемь групп троекратных повторов доз стимуляторов.

ное требование, предъявляемое к биотесту и заключающееся в том, что каждая отдельная доза стимулятора должна быть проведена на достаточном количестве «объектов» или повторов, можно выполнить при использовании иммобилизованных клеток с помощью единственного монослоя. Однако, чтобы облегчить последующую статистическую обработку получаемых результатов, в нашей лаборатории используют, как правило, 3—4 повтора монослоев на каждую дозу тестируемого стимулятора. Общее число используемых в биотесте монослоев должно быть достаточным для проведения по крайней мере трех определений каждой дозы тестируемого стимулятора, а также соответствующей серии контрольных и стандартных препаратов исследуемого гормона.

В пределах одной и той же платы для биотестирования все инкубационные лунки, а следовательно и все монослои, находятся в одинаковых условиях с точки зрения температуры, влажности, концентрации CO_2 в воздухе и состава питательной среды. Случайное распределение тестируемых проб по плате отнюдь не обязательно, поэтому одинаковые дозы стимулятора можно наносить на соседние монослои, как показано на рис. 9-7. Тем не менее при таком распределении образцов по плате при проведении биотеста следует соблюдать две предосторожности. Первая из них состоит в том, что необходимо обратить особое внимание на время действия стимулятора на клетки, которое должно быть одинаковым для всех монослоев на плате. Следует прекращать инкубацию точно в том же порядке, в каком добавляли стимулятор к клеткам, что особенно важно в случае стандартных препаратов стимулятора, поскольку значения ответов клеток на их действие используют для построения графика зависимости доза—ответ. Так, при нанесении стимулятора на монослои в порядке возрастания доз любое заметное различие во времени инкубации монослоев с минимальной и максимальной дозами стимулятора может привести к искажению кривой доза—ответ. Однако, если ответ на каждую дозу гормона до его удаления уже достиг максимального уровня, некоторое отклонение во времени инкубации не оказывает существенного влияния на величину ответа клеток.

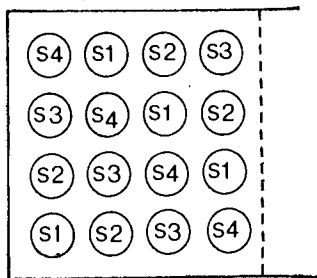


Рис. 9-8. Распределение доз стимулятора на 24-луночной плате по схеме «латинский квадрат» (4×4). В данном случае каждую дозу стимулятора наносили на четыре монослоя клеток.

Чтобы установить, влияют ли небольшие различия во времени инкубации повторов культур на ответы клеток в случае серии возрастающих доз стимулятора при прочих равных условиях, необходимо провести эксперимент, в котором все подобные эффекты сведены к нулю. Этого можно достичь, распределяя серию доз стандартного препарата гормона по плате в виде «латинского квадрата», как показано на рис. 9-8. Кривую доза—ответ, полученную в результате этого эксперимента, сравнивают с аналогичной кривой, построенной по результатам опыта с традиционной схемой распределения доз гормона (рис. 9-7).

При распределении по схеме «латинский квадрат» дозы гормона на следует добавлять и удалять из лунок в порядке их распределения на плате, например в горизонтальном направлении слева направо, начиная с левой верхней лунки. При добавлении и удалении стимуляторов в одной и той же последовательности среднее время инкубации для каждой отдельной дозы гормона практически одинаково.

Вторая предосторожность состоит в том, что при разработке и практическом применении биотеста, основанного на использовании повторов монослоев клеток, необходимо подобрать соответствующие методы контроля за проведением биотеста. Применение стандартных калиброванных препаратов гормона для оценки отклонений величин ответов клеток от опыта к опыту описано в разд. 6. Однако при проведении отдельного биотеста, основанного на использовании клеток, полученных из одной и той же исходной ткани или субкультуры, количественную оценку отклонений или «сдвигов» клеточных ответов в пределах одного определения можно провести, нанося на один из повторов монослоев на каждой плате известную дозу стандартного препарата гормона. Необходимо выявлять любые значительные отклонения между величинами ответов клеток на действие этого стандартного препарата стимулятора в различных платах с повторами культур и устранять их причины.

4.2. Практические методики биотестирования

Через 7—10 сут после начала культивирования первичные монослои иммобилизованных клеток можно использовать в качестве ткани-мишени для биотестов. Последовательность основных операций при проведении типичного биотеста приведена на рис. 9-9; детальное описание каждой стадии дано в табл. 9-3.

4.3. Оценка ответа клеток

По окончании инкубации с гормоном проводят экстракцию продуктов реакции из иммобилизованных клеток или инкубационной среды и оценивают ответ клеток на каждую дозу стимуля-

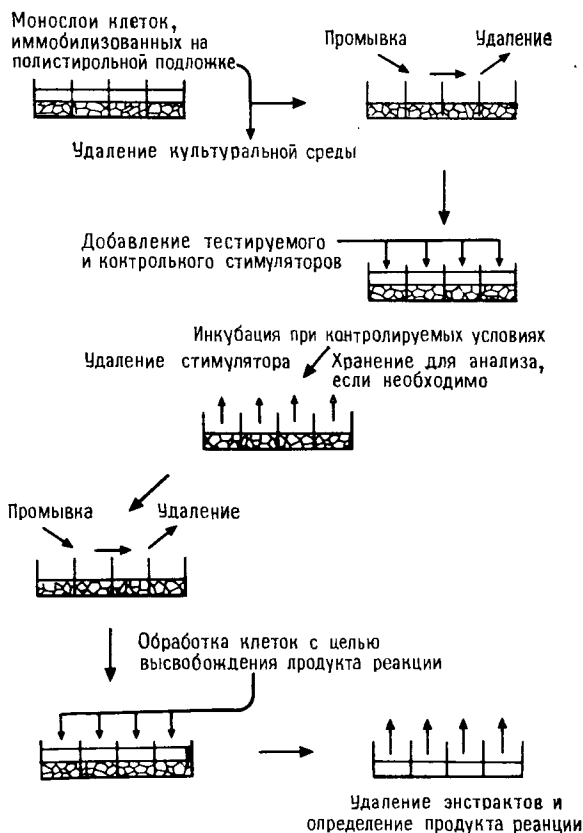


Рис. 9-9. Последовательность операций при проведении типичного биотеста, основанного на функциональном ответе иммобилизованных в монослой клеток-мишеней.

Таблица 9-3. Биотестирование

1. С помощью стерильной пастеровской пипетки удалить питательную среду, используемую на начальной стадии культивирования клеток¹⁾.
2. Каждый монослой клеток быстро промыть предварительно нагретым до 37°C солевым раствором Хэнкса, который затем удалить, как описано выше, оставив на поверхности монослоя культуры тонкую пленку жидкости.
3. На каждый монослой нанести тестируемый или контрольный стимулятор, записав порядок и время нанесения.
4. Культуры поместить в инкубатор, где в течение всего инкубационного периода они находятся в постоянных условиях.
5. По истечении необходимого времени инкубации удалить с поверхности монослоев стимуляторы, пользуясь чистой пастеровской пипеткой для каждой серии опытов²⁾.
6. Каждый монослой быстро промыть солевым раствором Хэнкса, как описано выше (п. 2).
7. В каждую лунку добавить 0,3 мл 12%-ной (вес/объем) хлорной кислоты³⁾.
8. Определить содержание специфического продукта реакции, находящегося в растворимой или нерастворимой в кислоте формах, с помощью наиболее подходящего для данного вещества метода количественного определения.

¹⁾ При удалении питательной среды необходимо следить за тем, чтобы пипетка не касалась слоя клеток, так как это может вызвать повреждение или потерю клеток, что отразится на ответе культуры в процессе биотестирования. Нельзя также допускать высыхания монослоев культуры после удаления среды; необходимо следить, чтобы клетки в лунках плат были постоянно покрыты тонким слоем жидкости.

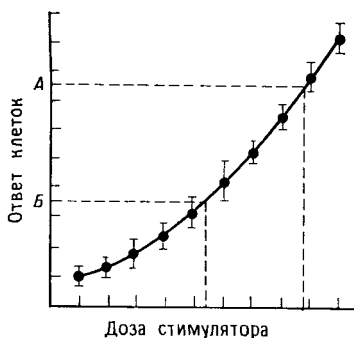
²⁾ После обработки иммобилизованных клеток стимулятором ряд продуктов реакции может перейти в инкубационную среду в количествах, пропорциональных степени стимуляции клеток. Эти вещества можно количественно определять с помощью стандартных биохимических или иммунологических методов. Если после обработки иммобилизованных клеток стимулятором определяемый продукт реакции остается внутри клетки, то необходимо его сначала экстрагировать и лишь затем проводить количественное определение. Для веществ, растворимых в кислотах, биотестирование можно продолжать в соответствии с пп. 6—8.

³⁾ Добавляя кислоту к клеткам, преследуют три цели: 1) прекратить действие стимулятора; 2) вызвать лизис клеток; 3) осадив белки, разделить белковые и небелковые компоненты.

тора, определяя количество продуктов реакции в каждом экстракте. Независимо от используемого метода определения полученные значения ответов клеток должны быть представлены в виде калибровочной кривой, обычно в виде кривой доза—ответ (рис. 9-10). Как отмечалось в разд. 4.1, обработка 3—4 повторов монослоев каждым образцом из серии последовательных разведений стандартного препарата стимулятора позволяет рассчитать среднее значение и стандартное отклонение (SD) ответов для каждого разведения. Ниже представлена последовательность операции.

1. Рассчитать среднее значение $\pm$ SD ответа клеток на каждое разведение стандартного препарата сравнения.
2. На миллиметровой бумаге или на бумаге с полулогарифмической координатной сеткой построить график зависимости

Рис. 9-10. Построение кривой доза — ответ, представляющей собой зависимость величины [среднее значение $\pm$ SD] ответа клеток от возрастающих доз стандартного препарата стимулятора. Значения ответов клеток на каждую дозу тестируемого стимулятора (А, В) экстраполируют на стандартную кривую и таким образом определяют дозу исследуемого гормона.



среднего значения $\pm$ SD ответа клеток от соответствующей дозы стандартного препарата стимулятора.

3. С помощью экстраполяции по калибровочной кривой рассчитать биологически активную дозу стимулятора для каждого из определяемых образцов.

На рис. 9-10 приведена типичная кривая доза—ответ и показано, как с помощью этой кривой, полученной при использовании стандартных препаратов, или препаратов сравнения, исследуемого стимулятора, можно рассчитать биологическую активность неизвестных образцов тестируемого гормона. В ряде случаев, чтобы устранить неудобства, связанные с малой крутизной типичной кривой доза—ответ, можно перейти к логарифмическим координатам. Получаемая при этом линейная зависимость доза—ответ облегчает определение биологической активности стимулятора в исследуемом образце.

5. Практическое применение метода: биотестирование тиреотропного гормона (ТТГ) с помощью иммобилизованных клеток щитовидной железы человека

Основные методики и операции, связанные с выделением, иммобилизацией и сохранением чувствительных к гормону клеток в монослоях, а также их последующее использование в качестве тканей-мишеней в биотестах можно проиллюстрировать на примере проведенных в нашей лаборатории экспериментов по использованию фолликулярных клеток щитовидной железы человека для определения биологической активности ТТГ. Эти эксперименты проводили с целью стандартизации препаратов бычьего ТТГ в качестве альтернативных «вторичных стандартов» по отношению к менее доступным препаратам ТТГ человека в рутинных лабораторных биотестах.

Таблица 9-4. Предварительная обработка и ферментативное диспергирование ткани щитовидной железы

1. Измельченную ткань щитовидной железы обработать препаратом «Dispase II» (1,2 ед./мл в солевом растворе Хэнкса, свободном от ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}) из расчета 10 мл препарата на 1 г ткани.
2. Через 1 ч слить надосадочную жидкость через боковую отводную трубку (рис. 9-5) и к осадку через горло колбы добавить равный объем свежего препарата «Dispase II».
3. Продолжить инкубацию еще в течение 2 ч. Отобрать надосадочную жидкость и профильтровать ее через несколько слоев стерильной хирургической марли в колбу, содержащую сыровотку плода коровы (СПК). Конечная концентрация сыровотки в фильтрате 1% ¹⁾.
4. По окончании процесса диспергирования суспендированные в среде клетки осадить низкоскоростным центрифугированием при комнатной температуре (200 g, 10 мин).
5. Образовавшийся осадок ресуспендировать с помощью стерильной силиконированной пастеровской пипетки в 10 мл среды «199» (Gibco-Europe Ltd., Пэйсли, Шотландия), содержащей 10% (по объему) СПК и 2 мМ глутамин ²⁾.
6. С помощью гемоцитометра определить конечный выход и жизнеспособность клеток.
7. Плотность клеточной суспензии довести до $5 \cdot 10^5$ /мл путем разбавления средой «199», содержащей сыровотку, а также 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2,5 мкг/мл фунгизона для предотвращения возможного заражения культуры бактериями, дрожжами и другими грибами.
8. В каждую лунку 24-луночных полистирольных плат (рис. 9-2) (Linbro Plasticware, Flow Laboratories Ltd., Ирвин, Шотландия) внести по 2 мл клеточной суспензии.
9. Культуры поместить в инкубатор (37 °C) в атмосферу, насыщенную водяными парами и содержащую 5% CO_2 .

¹⁾ В таком двухстадийном процессе ферментативного диспергирования на первой стадии удается почти полностью избавиться от эритроцитов, клеток соединительной ткани и одиночных фолликулярных клеток щитовидной железы. На второй стадии диспергирования при повторной ферментативной обработке измельченной ткани клетки высвобождаются из интактных фолликул щитовидной железы. Процесс можно контролировать, анализируя периодически отбираемые пробы с помощью фазово-контрастного микроскопа с низким разрешением.

²⁾ Во время этой процедуры слабая остаточная активность фермента, соосажденного с клетками, эффективно ингибируется при разбавлении в процессе ресуспендирования клеток.

5.1. Выделение и иммобилизация клеток

Суспензию жизнеспособных фолликулярных клеток щитовидной железы человека готовят ферментативным диспергированием кусочков ткани, полученных при тирэктомии. Каждый препарат клеточной суспензии готовят только из одного образца ткани щитовидной железы. Сначала ткань промывают в солевом растворе Хэнкса, а затем измельчают и обрабатывают в соответствии с методиками, описанными в разд. 3.1 и полностью приведенными в табл. 9-4.

Через четыре дня после начала культивирования фолликулярные клетки щитовидной железы уплощаются и прикрепляются к

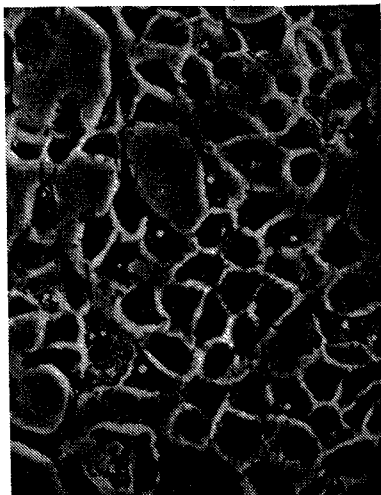


Рис. 9-11. Первичная монослойная культура фолликулярных клеток щитовидной железы человека, наблюдаемая в фазово-контрастный микроскоп ($\times 460$) через 96 ч после внесения суспензии в лунку.

поверхности лунки полистирольной платы (рис. 9-1). Такие монослойные культуры клеток можно затем использовать в качестве тканей-мишеней для биотестирования ТТГ. Если менять среду каждые 3—4 сут, то монослой могут сохранять способность к ответу в течение еще 4—7 сут, прежде чем станет заметной дедифференцировка клеток и начнется избыточный рост фибробластов.

5.2. Биотестирование тиреотропного гормона (ТТГ)

В нашей лаборатории в качестве «вторичных» стандартов использовали несколько препаратов бычьего ТТГ, полученных из разных коммерческих источников (после калибровки относительно ТТГ человека). Биологическую активность всех тестируемых препаратов ТТГ определяли по их способности стимулировать накопление внутриклеточного cAMP в первичных монослойных культурах фолликулярных клеток щитовидной железы человека. Определение проводили через 4—11 сут от начала культивирования клеток *in vitro*. В табл. 9-5 и 9-6 описаны практические методики, используемые для калибровки образцов бычьего ТТГ, на примере препарата «Thytropar» (Armour Pharmaceuticals, Канкаки, Иллинойс, США), который поставляется в лиофилизованном виде с лактозой в качестве наполнителя и имеет активность 10 ед. на 1 ампулу. Препарат ТТГ человека высокой степени очистки, по отношению к которому калибруют в качестве «вторичного» стандарта бычий ТТГ, представляет собой первый международный препарат сравнения (First International Reference Preparation) тиреотропного гормона человека (ТТГ гипофиза, жодовый номер 68/38) с активностью 150 мЕд. на ампулу.

Таблица 9-5. Биотест на тиреотропный гормон (ТТГ)

1. Для получения исходного раствора лиофилизированные стандартные и нестандартизованные препараты ТТГ растворить в солевом растворе Хэнкса.
2. Приготовить серию последовательных разведений каждого препарата ТТГ¹⁾.
3. Чтобы начать анализ, необходимо отсосать питательную среду из культур и промыть клеточные монослои один раз солевым раствором Хэнкса. Затем к каждому монослою добавить соответствующую дозу ТТГ в солевом растворе Хэнкса, приготовленную как описано выше, и 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксантин (ИМК)²⁾.
4. Прониккубировать культуры при 37°C в течение 20 мин в воздушной атмосфере с 5% CO₂.

¹⁾ В такой серии последовательных разведений наименьшая доза определяемого гормона может составлять 1/100 его максимальной дозы. Необходимое количество каждого разведения гормона готовят таким образом, чтобы его хватило на 3×1 мл повтора, т. е. из расчета 1 мл на каждый из трех монослоев клеток-мишеней, используемых для каждого определения. Как правило, для определения активности неизвестного образца относительно активности «первичного стандартного препарата» достаточно восьми разведений каждого препарата ТТГ.

²⁾ Добавленный в инкубационную среду ИМК эффективно ингибирует внутриклеточные фосфодиэстеразы и, таким образом, усиливает ответ по cAMP на каждую исследуемую дозу ТТГ.

Таблица 9-6. Экстракция и определение содержания cAMP

1. Закончив инкубацию культур с ТТГ, быстро отсосать инкубационную среду с монослоев клеток.
2. В каждую лунку добавить 0,5 мл абсолютного этанола, охлажденного во льду.
3. Закрыть платы и поместить их в морозильную камеру (−20°C) на 24 ч¹⁾.
4. Осажденный белок удалить центрифугированием (2000 g, 15 мин, 4°C).
5. Этанольные фракции порциями по 200 мкл перенести в небольшие стеклянные пробирки и выпарить досуха в токе азота.
6. Сухие остатки, содержащие cAMP, растворить в специальном буфере для определения cAMP (25 мМ трис, 50 мМ NaCl, 8 мМ теофиллин, 6 мМ меркаптоэтанол).
7. В клеточных экстрактах определить содержание cAMP.
8. Конечные уровни cAMP, достигаемые в сериях из трех повторов в ответ на каждую исследуемую дозу ТТГ, выразить в пикомолях на 1 монослой (среднее значение ± SD)²⁾.

¹⁾ При такой обработке происходит эффективный лизис клеток и осаждение внутриклеточных белков, тогда как cAMP остается в растворе. Для полной гомогенизации клеточных компонентов после добавления этанола монослои можно разрушить с помощью резиновой палочки.

²⁾ При расчете предполагают, что плотность клеточных популяций в повторах одинакова; это можно проверить, определив содержание белка или ДНК в монослоях одной серии повторов. Если культуры внесены в лунки достаточно аккуратно, то для препаратов, полученных из одной и той же клеточной суспензии, отклонение в содержании ДНК для разных монослоев не должно превышать 5%.

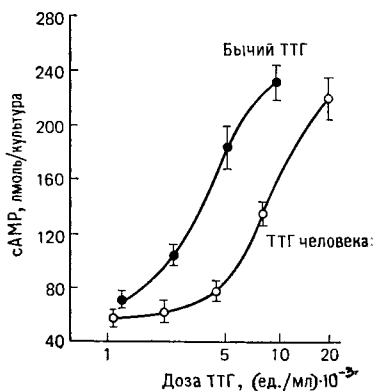
Мы определяли сАМР методом конкурентного связывания с белком [14], используя связывающий белок, который обладает высокой специфичностью по отношению к данному нуклеотиду. Измеряют сАМР и другими методами [15], в том числе методом, основанным на использовании антител, специфичных к сАМР [16]. Главное преимущество последнего метода — его повышенная чувствительность, благодаря которой можно определять очень низкие концентрации сАМР. Однако в большинстве случаев, когда имеется достаточное количество сАМР для анализа, более удобным и воспроизводимым является метод конкурентного связывания с белком. Связывающий белок можно хранить при -20°C в течение длительного времени (2—3 года), а коммерческие препараты ^3H -сАМР имеются в продаже.

5.3. Анализ кривой доза—ответ

1. По данным о накоплении внутриклеточного сАМР в монослойных клетках щитовидной железы в ответ на действие бычьего и человеческого ТТГ строят кривые доза—ответ, как показано на рис. 9-12.

Соотношение между ответом клеток и дозой стимулятора соблюдается только в строго определенных условиях инкубации и во многих случаях в значительной степени зависит от времени инкубации, температуры, pH и ионной силы инкубационной среды. При проведении сравнительных исследований, подобных описанному в данном разделе, необходимо следить за тем, чтобы условия инкубации при биотестировании обоих исследуемых препаратов ТТГ были одинаковыми. Следует отметить, что зависимости ответа клеток от дозы стимулятора, приведенные на рис. 9-12, не

Рис. 9-12. Накопление сАМР в первичных монослойных культурах клеток щитовидной железы человека в результате инкубации с бычьим ТТГ ("Thytropar", Armour Pharmaceuticals) или ТТГ человека (First International Reference Preparation, кодовый номер 68/38). Активность бычьего ТТГ выражена в единицах, указанных для препарата фирмой-изготовителем, а активность ТТГ человека — в стандартных единицах, принятых Национальным институтом стандартов и контроля за качеством биологически активных соединений, Лондон (National Institute of Biological Standards and Control). Время инкубации в обоих случаях 20 мин. Результаты представлены в виде средней величины $\pm \text{SD}$ ответов трех повторов культур на каждую тестируемую дозу ТТГ.



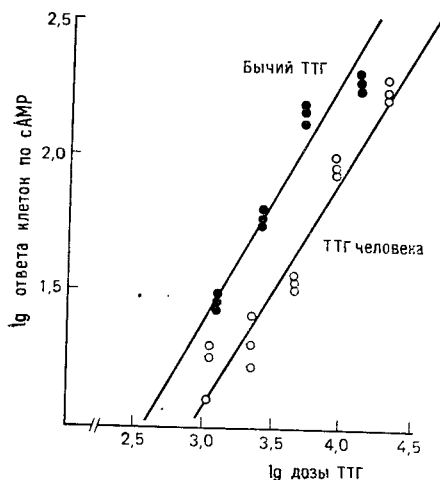


Рис. 9-13. Логарифмическое преобразование кривых доза — ответ для бычьего ТТГ и ТТГ человека, изображенных на рис. 9-12. Для каждой дозы ТТГ приведены значения ответов клеток каждого из трех повторов монослоев.

являются линейными; гораздо удобнее анализировать и сравнивать данные двух экспериментов, прологарифмировав значения доз стимуляторов и величины ответов клеток на их действие. Линейные графики, полученные таким способом, изображены на рис. 9-13. Используя соответствующие методы статистической обработки полученных данных [17], можно установить, что кривые доза—ответ для человеческого и бычьего ТТГ практически параллельны и в рассматриваемом случае значения тангенсов углов наклона для них составляли 0,89 и 0,91 соответственно.

2. Если удалось получить постоянное соотношение ответов клеток на действие возрастающих доз бычьего и человеческого ТТГ, рассчитывают отношение эффективностей этих двух препаратов.

В рассматриваемом примере эффективность бычьего ТТГ оказалась в 2,5 раза выше, чем эффективность человеческого ТТГ. Соответственно каждую дозу определяемого препарата бычьего ТТГ можно выразить в единицах активности ТТГ человека. Таким образом, менее доступные препараты ТТГ человека можно успешно заменять на препараты бычьего ТТГ и использовать их в качестве «вторичных стандартов» при проведении лабораторных биотестов на ТТГ человека.

6. Контроль за проведением биотеста

При разработке биотестов часто упускают из виду, что для объективной оценки эффективности данного метода анализа необходимо использовать подходящие тщательно разработанные способы контроля за качеством проведения биотеста. Такие спо-

собы включают в себя главным образом количественную оценку колебаний величины ответов клеток от опыта к опыту на действие строго определенных доз ряда стандартных препаратов сравнения. Это особенно важно при биотестировании, проводимом с помощью первичных монослойных культур клеток, поскольку ответы клеток, полученных из разных исходных образцов ткани, часто сильно варьируют. В этом разделе кратко изложены основные принципы, используемые при разработке подобных способов контроля.

6.1. Необходимость контроля при проведении биотеста

Одним из основных свойств чувствительных к гормону клеток, иммобилизованных в первичные монослойные культуры, является присущая им вариабельность ответа на действие стимулятора *in vitro*. Следовательно, никогда нельзя рассчитывать на то, что при проведении большой серии биотестов, основанных на ответах клеток, полученных из разных исходных тканей, их эффективность будет постоянной. Это справедливо даже в случае непрерывного культивирования или стабильных клеточных линий. Любые случайные изменения состава ростовой среды или сыворотки, используемой в качестве одного из ее компонентов, могут вызвать постепенные изменения характера роста клеток-мишеней, а также их способности к ответу. В случае первичных культур на величину суммарного ответа всей клеточной культуры влияет присутствие не чувствительных к действию стимулятора, или «примесных», клеток, а в случае непрерывных или стабильных клеточных линий всегда следует учитывать наличие в среде микоплазм как одного из возможных факторов, обуславливающих вариабельность клеточных ответов.

6.2. Простейшая схема контроля за проведением биотеста

Любой разработанный способ контроля за проведением серии последовательных биотестов, основанный либо на проверке способности к ответу отдельных культур клеток, полученных из разных исходных тканей, либо на регистрации постепенных изменений характеристик ответов какого-либо штамма клеток для непрерывного культивирования или стабильной клеточной линии, должен включать в себя многократное определение ответа клеток на действие строго определенной дозы контрольного стимулятора, или стимулятора сравнения, или же серии таких стимуляторов с известной для каждого эффективностью. При таком способе контроля любое заметное отклонение величины наблюдаемого ответа клеток от среднего значения ответа, определенного по результатам предыдущих биотестов, может свидетельствовать об изменении свойств культуры клеток и, следовательно, может указывать

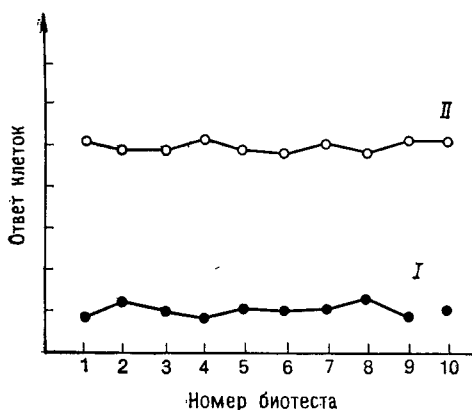


Рис. 9-14. Простейшая схема контроля за проведением биотеста, основанного на измерении в каждой серии анализов величины ответов клеток на действие двух стандартных препаратов стимулятора (I, II). Для каждого используемого стандартного препарата сравнения величину ответа клеток можно сравнить с величиной [среднее значение $\pm SD$] ответа, полученной в предыдущих биотестах данной серии.

на то, что результатами данной серии биотестов следует пренебречь. На практике для большинства проводимых биотестов основные требования, предъявляемые к данному простейшему способу контроля, удастся легко выполнить, включив в схему биотеста анализ ответов клеток на действие соответствующих доз стандартного препарата сравнения гормона для построения кривой доза—ответ. Для более тщательного контроля за проведением биотеста среди выбранных доз гормона должно быть несколько из диапазона доз, наиболее часто встречающихся в тестируемых образцах. В случае определения гормонов в сыворотке человека значения этих доз должны входить в диапазон физиологических доз тестируемого гормона. Можно также включить в биотест дополнительные дозы стандартных препаратов сравнения, соответствующие пределу чувствительности проводимого биотеста, т. е. очень низкие дозы гормона, в то время как при биотестировании образцов сыворотки с повышенным содержанием гормона следует использовать дозы стандартного препарата сравнения, превышающие нормальный физиологический уровень тестируемого гормона. Для каждой серии биотестов, основанных на применении клеток, полученных из различных исходных тканей или субкультур стабильных клеточных линий, ответы клеток на действие каждой отдельной дозы стандартного препарата сравнения можно представить графически, как показано на рис. 9-14. В этом случае значение ответов клеток на действие данной дозы в контролируемом биотесте можно сравнить со средним значением ответов клеток на действие той же дозы тестируемого гормона, полученным в предшествующей серии биотестов. Результаты биотестов, в которых величины ответов клеток отклоняются от величины [среднее значение $\pm SD$] следует считать недостоверными, и ими можно пренебречь.

7. Рекомендуемые поставщики реактивов и оборудования для культивирования клеток

7.1. Оборудование для культивирования (стекло)

Arnold R. Horwell Ltd.,
2 Grangeway,
Kilburn High Road,
London NW6 2BP, UK

Bellco Glass Inc.,
Vineland,
NJ 08360, USA

7.2. Одноразовые пластмассовые принадлежности и реактивы для культивирования

Flow Laboratories Ltd.,
PO Box 17,
Second Avenue Industrial Estate,
Irvine KA12 8NB, UK

Flow Laboratories Inc.,
7655 Old Springhouse Road,
McLean,
VA 22102, USA

Gibco Europe Ltd.,
Trident House,
PO Box 35,
Renfrew Road,
Paisley PA3 4EF, UK

Grand Island Biological Co.,
Grand Island,
NY 14072, USA

Литература

1. Ekins R. P. In: Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, vol. 1, International Atomic Energy Agency, Vienna, p. 241, 1978.
2. Grinell E. Int. Rev. Cytol., 53, 65 (1978).
3. Ambesi-Impiombato F. S., Parks L. A. M., Coon H. G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3455 (1980).
4. Ambesi-Impiombato F. S., Picone R., Tramontano D. In: Growth of Cells in Hormonally-defined Media, Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation, vol. 9 (Sato G. H., Pardee A. and Sirbasku D. A., eds.), New York, p. 483, 1982.
5. Bottenstein J., Hayashi I., Hutchings H., Masui J., Mather D. B., McClure S., Ohasa A., Rizzino A., Sato G., Serrero G., Wolfe R., Wu R. Methods Enzymol., 58, 94, 1979.
6. Barnes D., Sato G. Cell, 22, 649 (1980).
7. Bidey S. P., Marshall N. J., Ekins R. P. Acta Endocrinol., 98, 370 (1981).
8. Powell-Jones C. H. J., Thomas C.-G., Nayfeh S. H. J. Biol. Chem., 255, 4001 (1980).
9. Ekins R. P. Br. Med. Bull., 30, 1 (1974).
10. Bidey S. P., Marshall N. J., Ekins R. P. J. Clin. Endocr. Metab., 53, 246 (1981).
11. Bidey S. P., Marshall N. J., Ekins R. P. Acta Endocrinol., 101, 359 (1982).
12. Kruse P. F., Peterson M. K. Tissue Culture Methods and Applications, Academic Press, New York, 1973.
13. Paul J. Cell and Tissue Culture, Fifth Edition, E. and S. Livingstone, London, 1979.
14. Brown B. L., Albano J. D. M., Ekins R. P., Sgherzi M. A., Tampion W. Biochem. J., 121, 561 (1971).
15. Holmegaard S. N. Acta Endocrinol., 101, Suppl. 249 (1982).
16. Steiner A. L., Wehmann R. E., Parker C. W., Kipnis D. M. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research, vol. 2 (Greengard P. and Robison G. A., eds.), Raven Press, New York, p. 51, 1972.
17. Finney D. J. Statistical Methods in Biological Assay, edn. 3, Griffin, 1978.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агар, включение клеток 61, 133, 158
Адсорбция, влияние на активность инвертазы и целлобиазы 16—17
— измерение активности адсорбированных инвертазы и целлобиазы 15—16, 19—20
— инвертазы на ДЭАЭ- и КМ-сефадексах 15—17
— клеток на крупнопористой керамике 137—139
— — — целлюлозе 135—137
— носители для иммобилизации 13—19
— растительных клеток 161
— свойства адсорбированных ферментов 24—29
— стабильность связи фермент—носитель 16—17
— целлобиазы на конканавалин А-сефарозе 18—21
Азидный метод связывания инвертазы с энзакрилами АА и АН 24
— — — получение электродов с коллагеновыми мембранами 89
— — — ферментов с носителями, активированными переходными металлами 46—47
Аймалицин, синтез иммобилизованными растительными клетками 167—169
Акриламид, активация хлоридом титана (IV) 40, 42
— включение ферментов в гель для ферментного электрода 74—76
— — — и клеток 56—58, 118—121
— ковалентное присоединение глюкозооксидазы 86—87, 90
— — — инвертазы 24—25
— сополимеры и производные 24
Акриловая кислота, ковалентное связывание глюкозооксидазы с диазопроизводным 87—91
Альгинат кальция, включение клеток 58—59, 129, 155—157
— — совместное включение дрожжей и иммобилизованной β -глюкозидазы 61—62
Аминоалкилированная целлобиаза 21—22
Аминоалкильные производные носителей, активированных титаном (IV) 47
Антрахиноны, синтез иммобилизованными растительными клетками 170
Аффинные носители, биоспецифические адсорбенты 18
Биокатализаторы, иммобилизация металлохелатным методом 30—52
Биотестирование тиреотропного гормона 199—201
Бифункциональный реагент, попереочное сшивание глутаровым альдегидом 45—46
Бутадиеновый каучук 69
Включение в гель *см.* Иммобилизация включением в гель
Влияние pH на активность и стабильность иммобилизованной инвертазы 26—27
20- β -Восстановление стероидов 144
Вращающиеся электроды, анализ электроактивных веществ 109—113
 β -Галактозидаза микрокапсулированная 67
Гелеобразование в присутствии двухвалентных катионов 58—59
— путем полимеризации 56—58
Гидразидное производное полиакриламида 65
Гидроксипатит 13
Гидроксид ванадия (III) 49
— циркония (IV) 49
Гидроксиды переходных металлов, иммобилизация клеток микроорганизмов 49—51
— — — ферментов 48—49

- 17- β -Гидроксистероид-дегидрогеназа 152
- 20- β -Гидроксистероид-дегидрогеназа 142
- Гликопротеины 183
- Глиоксаль 159
- Глутаматдегидрогеназа в ферментном электроде 75
- Глутаровый альдегид 45—46
- Глюкоамилаза, иммобилизация на носителях, активированных титаном (IV) 33—35
- поперечное сшивание 45
- Глюкоза в структуре целлюлозы 32
- действие на адсорбированную целлюлозу 20
- продукт реакции при определении активности целлюлазы и инвертазы 15, 19
- ферментные электроды для ее определения 74, 77, 82, 94
- β -Глюкозидаза 61
- в ферментном электроде 73, 76—77
- иммобилизация на конканавалин А-сефарозе 12
- — сефарозе, активированной бромцаном 62
- совместное включение с дрожжевыми клетками в альгинат кальция 62
- Глюкозоизомеразы, иммобилизация на носителях, активированных титаном (IV) 36
- Глюкозооксидаза в ферментном электроде 72, 74, 77, 92
- иммобилизация на ацилазидном производном полиакриламида 85
- — диазопроизводном полиакриловой кислоты 87
- — целлюлозе, активированной титаном (IV) 35
- каталитическая реакция 92
- стабильность на ферментном электроде 77
- Гранулы декстрана, иммобилизация клеток млекопитающих 178
- Графит, иммобилизация кофакторов или ферментов 99
- Датчики, основанные на взаимодействии антиген — антитело, определение креатинкиназы М 94
- Δ^1 -Дегидрирование 122—123
- гидрокортизона 116—118
- ингибирование 117
- клетками *Arthrobacter globiformis* 117, 123—127
- — включенными в полиакриламидный гель 121—122
- Диазотирование носителей, активированных переходными металлами 46—48
- при изготовлении электродов с коллагеновыми мембранами 89
- Дигитоксин, 12- β -гидроксилирование иммобилизованными растительными клетками 165—166
- Диметилсульфоксид, пермеабиллизация растительных клеток 172—173
- Дифференциальная импульсная вольтамперометрия с использованием иммобилизованных веществ 108—109
- Дыхание как индикатор жизнеспособности растительных клеток 163
- ДЭАЭ-декстран, адсорбция растительных протопластов 161
- ДЭАЭ-сефадекс, адсорбция инвертазы 14—15
- влияние pH на адсорбированную инвертазу 26—27
- стабильность связи инвертазы — ДЭАЭ-сефадекс 16—17
- Изготовление электродов 82—88
- 3-Изобутил-1-метилксантин, ингибитор фосфодиэстераз 200
- Изомеры аймалицина, путь биосинтеза 167
- Иммобилизация включением в гель дрожжевых клеток и β -глюкозидазы в альгинат кальция 61—62
- — — изготовление ферментных электродов 81—83
- — — клеток в агар 60—61, 133, 158—159
- — — альгинат кальция 58—59, 129—130, 155—159
- — — белковые мембраны 133
- — — κ -каррагинан 60, 130—131, 158
- — — мембрану из поливинилового спирта 131
- — — пенополиуретан 161
- — — фотосшитые полимеры 132
- — — и ферментов 53—64, 118, 120, 130—133, 155—161
- — — в полиакриламид 57—58, 118—120, 159. См. также Микрокапсулирование
- в мембранах растительных клеток 161
- — — ферментов 82—84

- окислительно-восстановительных групп 98—101
- Иммобилизованные клетки млекопитающих 177—178, 181—183, 188—192, 198—199
- растительные клетки 154—162
- Инвертаза, иммобилизация металлохелатным методом 35
- — методом адсорбции 15—17
- — ковалентного связывания 23—25
- кинетические свойства 26—29
- Индолсодержащие алкалоиды, получение с помощью иммобилизованных растительных клеток 170
- Ионные связи при адсорбции 12
- Карбоксильные группы, активация 89, 100
- Карбоксиметил-сефадекс, адсорбция инвертазы 15—17
- Карбол-функси 163, 165
- Каррагинан, включение клеток 60, 130—131, 158
- Каталаза микрокапсулирование 69—70
- Катенаминредуктаза, биосинтез аймалицина 166—167
- Кинетика иммобилизованных ферментов 26—29, 33—36, 68
- Кислородный электрод 72, 79, 80, 82, 92
- Клетки микроорганизмов, иммобилизация металлохелатными методами 50—51
- — методом включения в гель 53—62
- млекопитающих, чувствительные к действию гормонов 188—190
- щитовидной железы, иммобилизация 198—199
- — использование при биотестировании ТТГ 199—201
- Коллагеновая мембрана при изготовлении электродов 85
- Конканавалин А, адсорбция целлобиазы 18—19
- термостабильность адсорбированной инвертазы 28
- Кофакторы, иммобилизация на графите, стекловидном угледе и платине 99—100
- Лактатдегидрогеназа в ферментном электроде 75
- Липид — полиамид, мембрана для микрокапсулирования 67
- Максимальная «нагрузка» носителя 25—26
- Массоперенос 109—113
- при микрокапсулировании 70—71
- Метилдигоксин 166
- Микрокапсулирование ферментов, методы 66—70
- Микрокристаллическая целлюлоза, носитель для иммобилизации ферментов 23, 34
- Монослой клеток млекопитающих, использование в биотестах 192—194
- — — приготовление 191—192
- Найлон, активация хлоридом титана (IV) 44
- мембрана для микрокапсулирования 67
- Никотинадениндинуклеотид, иммобилизация на графите 99—100
- Нитратредуктаза в ферментном электроде 76
- Носители, активированные переходными металлами 31—51
- белковой природы, активация хлоридом титана (IV) 40—43
- Окислительные группы, иммобилизация на поверхности электродов 98—101
- 3-Оксостероид- Δ^1 -дегидрогеназа 139
- Δ^1 -дегидрирование гидрокортизона 117
- 3-Оксостероид- Δ^1 -редуктаза 141
- pH-Оптимум активности ферментов 36
- Пенициллиназа в ферментном электроде 75, 92—93
- Первичные культуры клеток в биотестах на гормоны 184, 192—195
- Периодат натрия, окисление углеводных остатков 21—22
- Платина в ферментных электродах 74—76
- иммобилизация кофакторов и ферментов 100—101
- Полиакриламид, ацилазидное производное 85, 90
- включение ферментов и клеток 56—58, 118—121, 159—160
- ковалентное связывание глюкозооксидазы 85
- — — инвертазы 24—25
- Полиакриловая кислота, диазопроизводное 87, 91

- — ковалентное связывание глюкооксидазы 87
- Полиакрилонитрил** 131
- Поливиниловый спирт**, включение клеток 131
- — в микрокапсулировании 67
- Поливинилпирролидон** 66—67
- Полистирол**, включение клеток 131
- носитель для иммобилизации клеток млекопитающих 178
- Полифениленоксид**, ковалентное связывание растительных клеток 162
- Полиэтиленгликольметакрилат** 132
- Полиэтиленимин** 66—67
- Полые трубчатые реакторы**, иммобилизация растительных клеток 161
- Поперечная сшивка** см. Бифункциональный реагент
- Потенциал в дифференциальной импульсной вольтамперометрии** 108—109
- — циклической вольтамперометрии 101—107
- Преднизолон**, субстрат для Δ^1 -гидрирования 141—142
- Препарат Dispase II**, разрушение тканей 189, 190, 198
- Рабочие параметры электродов** 73—78
- Реакторы для включения в гель** клеток и ферментов, конструирование 62—63
- — трансформации стероидных соединений 121—122
- Рецепторы**, специфичные к действию гормонов 185—186
- Рост и деление** как показатель жизнеспособности клеток 164
- Сефадекс** 14—17
- Сефароза**, активированная бромцанном 21—23
- ковалентное связывание целлобиазы 21—23
- Сефароза 4В**, ковалентное связывание β -глюкозидазы 62
- Силикагель**, ковалентное связывание клеток 138—139
- носитель для иммобилизации ферментов 35
- Стекло**, гранулы для иммобилизации клеток млекопитающих 178
- пористое, активация хлоридом титана (IV) 40
- поперечное сшивание иммобилизованной глюкоамилазы 45
- порошок для иммобилизации глюкоамилазы 34—35
- с порами контролируемого размера 35, 37, 38, 45
- Стекловидный углерод**, носитель для иммобилизации кофакторов или ферментов 100—101
- Стекловолокно** для иммобилизации папаина 35
- Термостабильность** растворимой и иммобилизованной инвертазы 28
- Тирозиндекарбоксилаза** в ферментном электроде 75
- Трансформация** стероидных соединений иммобилизованными клетками 141—152
- Уратоксидаза** в ферментном электроде 76
- Уреаза** 35
- в ферментном электроде 74, 88—89
- константа Михаэлиса (K_M) 68
- микрокапсулированная 68
- Ферментативное диспергирование** тканей млекопитающих 184, 189—191, 198
- Ферментные электроды**, аппаратура и материалы 79—81
- — изготовление 82—86
- — использование 86—88
- — наличие в продаже 94
- — примеры 88—94
- — рабочие параметры 73—78
- — типы 74—75
- Ферменты**, адсорбция и ковалентное присоединение 12—29
- включение в гели 53—63
- иммобилизованные металлохелатным методом 33—36
- источники 93
- поперечное сшивание 45—46
- свойства 24—29, 33—36
- фирмы-изготовители 14, 80, 94
- Ферроцианид калия**, окисление на вращающемся дисковом электроде 112
- Флавинадениндинуклеотид (FAD)**, адсорбция на спектроскопически чистом графите 100
- вольтамперограммы 106
- Флуоресцеиндиацетат (ФДА)** 162, 165
- Фосфатаза** в ферментном электроде 76

- Фотосшитые полимеры, включение клеток 132—133
- Хингидронный электрод 74, 92
- Хлорид ванадия, активация целлюлозы 34
- — получение гидроксидов переходных металлов 48
 - кальция, получение геля альгината кальция 59
 - титана (IV), активация носителей 31, 39—40
 - — — белковой природы 40—43
 - пиркония, активация целлюлозы 34
 - — — получение гидроксидов переходных металлов 48
- Хлористый метилен, активация носителей белковой природы 42
- Целлобиаза, адсорбция и ковалентное связывание 13—29
- измерение активности 19—20
 - иммобилизация на конканавалин А-сефарозе 18—19
 - ковалентное присоединение к сефарозе, активированной бромцианом 21—22
 - константа Михаэлиса (K_M) 28
 - максимальное связывание с конканавалин А-сефарозой 25
- Целлюлоза, адсорбция клеток 134—137
- активация хлоридом титана (IV) 31—32
 - кинетические параметры иммобилизованных ферментов 28, 36
 - металлохелатный метод иммобилизации ферментов 31, 34—35
 - носитель для адсорбции ферментов 13
 - обработанная титаном 32—33
 - присоединение инвертазы 23
- Целые клетки в электродных датчиках 93
- Циклическая вольтамперометрия с использованием иммобилизованных веществ 101—107
- Циклический АМР (сАМР) 200—201
- Циклогексан микрокапсулирование ферментов 69
- Электрод сравнения в циклической вольтамперометрии 101—102
- ферментный 79—80
- Эмульгирующий агент Span 85 68—69
- Энзакрилы АА и АН, диазотирование и присоединенные ферменты 12
- — — иммобилизация инвертазы 24—25
- 1-Этил-3(3-диметиламинопропил)-карбодимид, активация карбоксильных групп 100
- Чувствительность биотеста при определении действия гормона 187

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие	7
Примечание издательства	7
Список авторов	8
Список сокращений	9
Введение. И. Д. Ж. Хиггинс	10
Глава 1. Имобилизованные ферменты: адсорбция и ковалентное присоединение. Джонатан Вудворд	12
1. Введение	12
2. Адсорбция при помощи ионного связывания с ДЭАЭ- и КМ-сефадексом	14
2.1. Подготовка носителя	14
2.2. Адсорбция инвертазной активности	15
2.2.1. Определение активности свободной или растворимой инвертазы	15
2.2.2. Связывание фермента с носителем	15
2.2.3. Активность адсорбированной инвертазы и стабильность связи фермент — носитель	16
3. Адсорбция ферментов на аффинных носителях	18
3.1. Носители аффинного типа	18
3.2. Подготовка носителя и присоединение к нему целлюбиазы	19
3.2.1. Определение активности свободной, или растворимой, целлюбиазы	19
3.2.2. Активность адсорбированной целлюбиазы и стабильность связи фермент — носитель	20
4. Ковалентное присоединение к сефарозе, целлюлозе и полиакриламиду	21
4.1. Присоединение целлюбиазы к сефарозе, активированной бромцианом	21
4.2. Присоединение инвертазы к микрористаллической целлюлозе	23
4.3. Присоединение инвертазы к полиакриламиду	24
4.3.1. Имобилизация коммерческого препарата инвертазы на энзакрилах АА и АН	24
5. Свойства адсорбированных и ковалентно связанных ферментов	24
5.1. Максимальная «нагрузка» носителя	25
5.2. Кинетические параметры иммобилизованных ферментов	26
Благодарность	29
Литература	29

Глава 2. Иммобилизация биокатализаторов металлохелатным методом.	<i>Джон Ф. Кеннеди и Иоаким М. А. Кабрал</i>	30
1. Введение		30
2. Иммобилизация ферментов металлохелатным методом		31
2.1. Методы иммобилизации ферментов на носителях, активированных переходными металлами		31
2.1.1. Первоначальный вариант металлохелатного метода		31
2.1.2. Химия иммобилизации фермента		31
2.1.3. Свойства ферментов, иммобилизованных металлохелатным методом		33
2.1.4. Проблемы металлохелатного метода		36
2.2. Развитие металлохелатного метода		39
2.2.1. Альтернативные методы активации неорганических носителей		39
2.2.2. Активация носителей белковой природы		40
2.2.3. Активация ионообменных носителей		43
2.2.4. Активация нейлоновых трубок		44
2.3. Поперечное сшивание ферментов, иммобилизованных металлохелатным методом		45
2.3.1. Поперечное сшивание глутаровым альдегидом		45
2.4. Иммобилизация ферментов на носителях, активированных переходными металлами		46
2.5. Иммобилизация ферментов и биомолекул на гидроксидах переходных металлов		48
3. Иммобилизация микробных клеток металлохелатным методом		49
3.1. Иммобилизация клеток микроорганизмов на гидроксидах металлов		50
3.2. Иммобилизация клеток на носителях, активированных переходными металлами		51
Литература		52
Глава 3. Иммобилизация клеток и ферментов включением их в гель.	<i>Марек П. Дж. Курстен и Майкл Н. Кафлан</i>	
1. Введение		53
1.1. Почему иммобилизация?		53
1.2. Применение иммобилизованных ферментов и клеток		54
2. Методы иммобилизации		55
2.1. Общие принципы		55
2.2. Включение ферментов в полиакриламидный гель		56
2.3. Включение клеток в полиакриламидные гели		57
2.4. Включение клеток в гель альгината кальция		58
2.5. Включение клеток в гели κ -каррагинана		60
2.6. Включение клеток в гели агара		60
2.7. Другие методы включения клеток в гели		61
2.8. Совместное включение ферментов и клеток		61
3. Конструирование реактора		62
Литература		63
Глава 4. Иммобилизация ферментов путем микрокапсулирования.	<i>Герберт Э. Клей, Дональд У. Сандстрем и Донгсеок Шим</i>	65
1. Введение		65
2. Методы микрокапсулирования		66
2.1. Применение микрокапсулирования для ферментов и биохимических систем		66
2.2. Методики эксперимента		68
3. Массоперенос		70
Литература		71

Глава 5. Ферментные электроды. Жорж Ж. Гильбо и Граци- лиано де Оливера Нето	72
1. Введение	72
2. Рабочие параметры электродов	73
3. Экспериментальная часть	79
3.1. Аппаратура	79
3.2. Необходимые материалы	80
3.3. Изготовление электродов	82
3.3.1. Физически удерживаемые ферменты	82
3.3.2. Ковалентно связанные ферменты	84
3.4. Как пользоваться ферментным электродом	86
4. Примеры ферментных электродов	88
4.1. Широко используемые ферментные электроды	88
4.2. Электродные датчики с использованием ферментов в це- лых клетках микроорганизмов и тканей	93
4.3. Датчики, основанные на взаимодействии антиген — анти- тело	94
4.4. Наличие датчиков в продаже	94
Литература	95
Глава 6. Электрохимические методы с использованием иммобилизо- ванных биоматериалов. Лемюэль Б. Уингард, мл.	96
1. Введение	96
2. Иммобилизация окислительно-восстановительных групп на поверхности электродов	98
2.1. Описание и подготовка носителей	98
2.2. Конкретные методики иммобилизации	99
3. Циклическая вольтамперометрия с использованием иммобили- зованных веществ	101
3.1. Описание циклической вольтамперометрии	101
3.2. Прибор и методика	102
3.3. Результаты и интерпретация	103
4. Дифференциальная импульсная вольтамперометрия с исполь- зованием иммобилизованных веществ	108
4.1. Метод и аппаратура	108
4.2. Результаты и их интерпретация	108
5. Определение сопротивления массопереносу с помощью вра- щающихся электродов	109
6. Краткое содержание и выводы	113
Благодарность	114
Литература	114
Глава 7. Иммобилизованные клетки: трансформация стероидов. К. А. Кошеченко, Г. В. Суходольская	115
1. Введение	115
2. Материалы и методы, используемые при трансформации сте- роидов	116
2.1. Δ^1 -Дегидрирование стероидных соединений	117
2.2. Включение в полиакриламидный гель	118
2.2.1. Трансформация стероидов с помощью клеток, вклю- ченных в полиакриламидный гель: реакция 1,2-де- гидрирования	131
2.2.2. Влияние условий иммобилизации на Δ^1 -дегидроге- назную активность	122
2.2.3. Многократное проведение процесса 1,2-дегидрирова- ния при помощи иммобилизованных клеток <i>A. globi-</i> <i>formis</i>	123

2.2.4. Дегидрирование в непрерывных условиях трансформации (реакторы типа 1 и 2)	127
2.3. Включение в альгинат кальция	129
2.4. Включение в κ -каррагинан	130
2.5. Включение в мембрану из поливинилового спирта и другие синтетические мембраны	131
2.6. Включение в фотосшитые полимеры	132
2.7. Включение в агаровый гель и в белковые мембраны	133
2.7.1. Агаровый гель	133
2.7.2. Белковые мембраны	133
2.8. Адсорбция	133
2.8.1. Адсорбция на целлюлозе	135
2.8.2. Адсорбция на крупнопористой керамике	137
2.9. Ковалентное связывание	138
2.10. Сравнительная характеристика методов иммобилизации	139
3. Другие процессы трансформации стероидных соединений	141
3.1. Δ^1 -Восстановление	141
3.2. 20β -Восстановление	142
3.2.1. Периодические трансформации	143
3.2.2. Непрерывные трансформации	144
3.3. 11α -, 11β -Гидроксילирование	151
3.4. Асимметричное 17β -восстановление 3-метокси- $\Delta^{1,3,5(10),9(11)}$ -8,14-секоэстратетрадиона-14,17	152
Литература	152
Глава 8. Иммобилизованные растительные клетки: методы получения и способность к биосинтезу. II. Броделиус	154
1. Введение	154
2. Методы иммобилизации растительных клеток	155
2.1. Включение в гель	155
2.1.1. Альгинатные гели	155
2.1.2. κ -Каррагинан	158
2.1.3. Агар/агароза	158
2.1.4. Полиакриламид	159
2.1.5. Другие носители	161
2.1.6. Иммобилизация в мембранах	161
2.2. Адсорбция	161
2.3. Ковалентное связывание	162
3. Жизнеспособность иммобилизованных растительных клеток	162
3.1. Окрашивание	162
3.1.1. Флуоресцеиндиацетат	162
3.1.2. Карбол-фуксин	163
3.2. Дыхание	163
3.3. Рост и деление клеток	164
4. Способность иммобилизованных растительных клеток к биосинтезу	164
4.1. Биоконверсия	165
4.1.1. 12β -Гидроксילирование	165
4.1.2. Восстановление двойной связи	166
4.2. Синтез из предшественников	168
4.3. Синтез de novo	169
4.3.1. Индолсодержащие алкалоиды	170
4.3.2. Антрахиноны	170
5. Экскреция продукта из клеток	171
5.1. Внеклеточные продукты	171
5.2. Внутриклеточные продукты	171
5.2.1. Спонтанная экскреция продукта	171
5.2.2. Индуцированная экскреция продукта	172

6. Заключение	174
Литература	175
Глава 9. Использование иммобилизованных клеток млекопитающих для количественного и качественного определения гормонов. Стефан П. Бидей	177
1. Введение	177
1.1. Иммобилизованные клетки млекопитающих	177
1.2. Биотест: общие представления	179
2. Иммобилизованные клетки в качестве тканей-мишеней в биотестах	181
2.1. Подложки для иммобилизации клеток	181
2.2. Иммобилизация клеток	182
2.3. Свойства клеток после иммобилизации	183
2.4. Выбор клеток-мишеней для биотестов	184
2.5. Выбор соответствующего ответа клеток	185
3. Получение и иммобилизация изолированных клеток	188
3.1. Получение из целых тканей клеток, чувствительных к действию гормона	188
3.1.1. Измельчение и ферментативное разрушение тканей	189
3.1.2. Определение выхода и жизнеспособности клеток	191
3.2. Иммобилизация клеток в виде монослоев	191
3.2.1. Получение повторов культур	191
3.2.2. Обработка клеток после иммобилизации	192
4. Обработка иммобилизованных клеток тестируемыми стимуляторами	192
4.1. Проведение биотеста: основные принципы	192
4.2. Практические методики биотестирования	195
4.3. Оценка ответа клеток	195
5. Практическое применение метода: биотестирование тиреотропного гормона (ТТГ) с помощью иммобилизованных клеток щитовидной железы человека	197
5.1. Выделение и иммобилизация клеток	198
5.2. Биотестирование тиреотропного гормона (ТТГ)	199
5.3. Анализ кривой доза — ответ	201
6. Контроль за проведением биотеста	202
6.1. Необходимость контроля при проведении биотеста	203
6.2. Простейшая схема контроля за проведением биотеста	203
7. Рекомендуемые поставщики реактивов и оборудования для культивирования клеток	205
7.1. Оборудование для культивирования (стекло)	205
7.2. Одноразовые пластмассовые принадлежности и реактивы для культивирования	205
Литература	205
Предметный указатель	206

НАУЧНОЕ ИЗДАНИЕ

Стефан П. Бидей, Иоаким М. А. Кабрал, Майкл П. Кафлэн и др.

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТКИ И ФЕРМЕНТЫ.
МЕТОДЫ

Под ред. Джонатана Вудворда

Заведующий редакцией чл.-корр. АН СССР Т. М. Турпаев
Зам. зав. редакцией М. Д. Гроздова. Научн. редактор Т. И. Пономарева
Мл. редактор И. А. Деменцова. Художник А. А. Захаров
Художественный редактор А. Я. Мусин. Технический редактор И. П. Гаврилина
Корректор Н. А. Гирия

ИБ № 6397

Сдано в набор 16.02.88. Подписано к печати 15.06.88. Формат 60×90¹/₁₆.
Бумага кн.-журн. сыкт. Печать высокая. Гарнитура обыкновенная.
Объем 6,75 бум. л. Усл. печ. л. 13,50. Усл. кр.-отт. 13,50. Уч.-изд. л. 16,65.
Изд. № 4/5363. Тираж 4850 экз. Зак. 129. Цена 2 р. 80 к.

Издательство «Мир»
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете
СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
113105, Москва, Нагатинская, 1